

**TAYNAH VICARI**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO MUTAGÊNICO DE DUAS CONCENTRAÇÕES  
(0,075µg/g E 0,75 µg/g) DO METILMERCÚRIO EM *Hoplias malabaricus* (PISCES)  
ATRAVÉS DOS ENSAIOS COMETA E MICRONÚCLEO.**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Genética.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Margarete Cestari.**

**Co-Orientador: Prof. Msc. Marcos Vinícius Mocellin Ferraro.**

**CURITIBA  
2009**

**ESPAÇO RESERVADO PARA O FUTURO TERMO DE APROVAÇÃO**

Aos melhores pais que eu poderia ter,  
**Sady e Nelcy.**

“Quero saber como Deus criou este mundo. Não estou interessado neste ou naquele fenômeno, ou no espectro deste ou daquele elemento. Quero conhecer seus pensamentos, o resto são detalhes.”

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

Gostaria muito de tecer alguns agradecimentos as pessoas que passaram pela minha vida, principalmente nestes dois anos de mestrado, e que influenciaram a minha vida, tanto minha vida acadêmica, para minha vida pessoal.

Devo à professora Dra. Marta Margarete Cestari, toda confiança, apoio, amizade e ajuda em momentos cruciais, nos quais até pensei muitas vezes em desistir, mas segui em frente devido às palavras de incentivo da pessoa que sempre será muito admirada por mim como mulher e pesquisadora que é.

Ao Marcos devo muitas broncas, muitas conversas estimulantes e como é o nosso co-orientador preferido, nós, meninas do laboratório, devemos um imenso obrigado por sempre estar por perto e tentar tornar o nosso trabalho mais prático e menos penoso. Como você mesmo diz em sua dissertação, gratidão é uma palavra muito mais completa pra definirmos certos sentimentos.

Ao Prof. Ciro e alunos do laboratório de Toxicologia Aquática – Dpto Biologia Celular, por sempre estarem por perto prontos para compartilhar informações e projetos importantes. Ao grupo Aquatóxi, por sempre ser unido e proporcionar uma vasta troca de experiências e conhecimentos.

Aos professores da banca de avaliação, Prof. Dr. Roberto Artoni, que desde o princípio da minha vida de aluna de Iniciação Científica se faz presente com sugestões oportunas, bem como ao Prof. Dr. Alberto Fenocchio pela sua amizade com todos do laboratório e sua avaliação.

Aos professores do Departamento de Genética, Erasto, Ricardo, Lupe, Karam, Maria Luiza, Iglenir, Ives, Valéria, Roseli e Marina, por mais do que nos passarem ensinamentos, por fazerem parte deste momento tão importante em nossas vidas.

A Wanessa, meu agradecimento especial por ter me ensinado e me ensinar sempre, tudo aquilo que aprende, com a maior paciência do mundo. Pena que as pessoas não possam ter dois co-orientadores, pois com certeza você seria um deles. Dizer muito obrigado por tudo sempre será pouco.

Aos meus colegas dos Laboratórios de Citogenética Animal, de Citogenética Humana, de Polimorfismos, de Genética Molecular Humana, de Imunogenética, de Microorganismos, pelo convívio mais do que divertido, amizade e apoio quando necessário. Em especial ao Danillo Gardenal Augusto, que aceitou de bom grado

dividir a árdua tarefa de representar os alunos nas reuniões do colegiado, me tendo ao seu lado como suplente e dividindo parte das funções comigo. O meu agradecimento também para Hugo da Silva Alves, que apesar de certos momentos de discordâncias, sempre se mostrou a pessoa certa para dividir os trabalhos das disciplinas, mesmo que involuntariamente.

Á todos os meus amigos do Laboratório de Citogenética Animal: Roger, Daniel (Pastel), Rafael Damian (Polly), Thaís, Rafa, Felipe, Maria Cristina, Ana Paula, Nédia, Giselle, Gabi, Rafael Balen, Íris, Luís Felipe (Fucão), Luís Fernando (Kbelo), Laercio, Paula e Janaína também os que já passaram por lá, Adriano, Thiago e Marcelo. Vocês fazem parte da minha segunda família, que faz tudo ficar mais leve e mais fácil. Muito obrigada especial por tudo.

Aos meus amigos da graduação, que sempre tentaram entender os motivos de minha ausência, sempre cobrando muito bem posteriormente: Milenie, Bianca, Nádia, Manuela, Mayara, Elaine, Augusto, Andressa, Jonas, José Vicente (Zé), Gustavo, Larissa, Nicolle, Rodrigo (Caderno) e Monica.

As minhas amigas que estão naquela pontinha do coração que está mais do que bem guardada: Sandra, Sílvia, Raquel, Caroline, Cristiane, Mayara, Milenie, Thaís, Wanessa, Giselle, Nédia, Patrícia, Márcia, Dellyana, Caroline e Carol Sens. Vocês souberam dar apoio na hora mais do que certa. Amo vocês.

Aos professores do Departamento de Genética, Erasto, Ricardo, Lupe, Karam, Maria Luiza, Eleidi, Ives, Valéria, Roseli e Marina, por mais do que nos passarem ensinamentos, por fazerem parte deste momento tão importante em nossas vidas.

Á secretária do Dpto de Genética Valéria e a ex-secretária do PPGGEN, Luciana, e a todos os funcionários especialmente Anilda, D. Adenir e D. Izolde.

Aos meus irmãos, *Iulyan*, *Kauane* e *Maria Rita*, por me amarem incondicionalmente e por sempre estarem por perto. Aos meus tios, primos e avós por entenderem a ausência e a distância.

Aos meus pais, *Sady* e *Nelcy*, a quem dedico todos os dias de minha vida, por sempre estarem do meu lado. Por sonharem comigo sempre, e principalmente por tornarem este sonho possível. Amo vocês.

E principalmente a *Deus*, que não deixa com que nada falte ou não seja possível.

## LISTA DE SIGLAS

CAS-	Chemical Abstract Service.
DNA-	Ácido desoxiribonucleico
EUA-	Estados Unidos da América
FAO-	Food and Agriculture Organization
HPA-	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IARC-	International Agency for Research on Cancer
IUPAC-	International Union of Pure and Applied Chemistry
LMP-	Low melting point
MN-	Micronúcleos
NER-	Nucleotide Excision Repair
ONU-	Organização das Nações Unidas
OSHA-	Occupational Safety and Health Administration
SCE-	Sister Chromatid Exchange
TEMS-	Terrestrial Ecosystems Monitoring Sites
USEPA-	United States Environmental Protection Agency
WHO-	World Health Organization

## LISTA DE SÍMBOLOS

%-	Percentual
μg-	Micrograma
μm-	Micrometro
Ca-	Cálcio
Cd-	Cádmio
cm-	Centímetro
cm <sup>3</sup> -	Centímetro cúbico
Co-	Cobalto
Cu-	Cobre
Da-	Daltons
Fe-	Ferro
g-	Gramma
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -	Peróxido de Hidrogênio
Hg-	Mercúrio
Kg-	Quilograma
l-	Litro
m-	Metro
mA-	miliampere
min-	minuto
ml-	mililitro
Mn-	Manganês
Mo-	Molibdênio
ng-	Nanograma
Ni-	Níquel
nM-	Nanomolar
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
°C-	Graus Celsius
Pb-	Chumbo
pH-	Potencial de Hidrogênio Iônico
S-	Enxofre
Sn-	Estanho
V-	Volt



Zn-

Zinco

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESULTADOS GERAIS ENCONTRADOS PARA OS ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS E OS ERITRÓCITOS COM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES.....	54
TABELA 2 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO ENCONTRADOS PARA OS ERITRÓCITOS MADUROS (NORMOCROMÁTICOS) E IMATUROS (POLICROMÁTICOS) ENTRE AS CÉLULAS NORMAIS E ALTERADAS.....	58
TABELA 3 – MÉDIA DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS IMATUROS (E.I.) (POLICROMÁTICOS) EM RELAÇÃO AO TOTAL ENCONTRADO (NORMOCROMÁTICOS + POLICROMÁTICOS). ....	58
TABELA 4 – MEDIANAS DO NÚMERO DE CÉLULAS ANALISADAS NO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS PARA OS RESPECTIVOS TIPOS DE DANO ENCONTRADOS.....	60
TABELA 5 – MEDIANA DOS ESCORES NO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS, JUNTAMENTE COM OS QUARTIS.....	60
TABELA 6 – MEDIANA DO NÚMERO DE CÉLULAS ANALISADAS NO ENSAIO COMETA DE CÉLULAS RENAI, COM OS RESPECTIVOS TIPOS DE DANO ENCONTRADOS.....	62
TABELA 7 – MEDIANA DOS ESCORES DO ENSAIO COMETA EM CÉLULAS DO TECIDO RENAL, JUNTAMENTE COM OS QUARTIS.....	62

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO DO MERCÚRIO EM AMBIENTES NATURAIS.....	28
FIGURA 2 – MODELO MOLECULAR EM 3D DO CÁTION DE METILMERCÚRIO. A ESFERA MAIOR E CINZA REPRESENTA A MOLÉCULA DE Hg E A ESFERA MENOR E PRETA REPRESENTA A MOLÉCULA DE CARBONO, LIGADA A TRÊS ESFERAS CLARAS MENORES, REPRESENTANDO AS MOLÉCULAS DE HIDROGÊNIO.....	29
FIGURA 3 - EXEMPLAR DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> , UTILIZADO NO PRESENTE TRABALHO. ....	35
FIGURA 4 – EXEMPLOS DE ERITRÓCITOS COM ALTERAÇÕES NUCLEARES ENCONTRADOS NOS EXEMPLARES (A, B, C, D, E, F, G, H, I), BEM COMO A PRESENÇA DE ERITRÓCITOS COM NÚCLEOS NORMAIS (J). ....	55
FIGURA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE TRATAMENTO, REALIZADA ATRAVÉS DAS MEDIANAS DO NÚMERO DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES ENCONTRADAS.....	55
FIGURA 6 – EXEMPLOS DE ERITRÓCITOS NORMOCROMÁTICOS (MADUROS) COM ALTERAÇÕES NUCLEARES ENCONTRADOS NOS EXEMPLARES (A, B, C, D, E, F, G, H, I), BEM COMO A PRESENÇA DE ERITRÓCITOS COM NÚCLEOS NORMAIS (J). ....	56
FIGURA 7 – EXEMPLOS DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS (IMATUROS), COM ALTERAÇÕES NUCLEARES ENCONTRADOS NOS EXEMPLARES (A, B, C, D, E, F, G, H, I), BEM COMO A PRESENÇA DE ERITRÓCITOS COM NÚCLEOS NORMAIS (J). ....	57
FIGURA 8 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS FREQUÊNCIAS DOS ERITRÓCITOS IMATUROS DE CADA GRUPO DE TRATAMENTO. ....	58
FIGURA 9 – CAPTURA DE IMAGEM DE UMA LÂMINA DE ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS, EVIDENCIANDO ALGUNS TIPOS DE DANO CELULAR. ....	59
FIGURA 10 – COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE TRATAMENTO REALIZADA ATRAVÉS DAS MEDIANAS DOS ESCORES DO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS ENCONTRADOS.....	61
FIGURA 11 – CAPTURA DE IMAGEM DE UMA LÂMINA DE ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAI, EVIDENCIANDO ALGUNS TIPOS DE DANO CELULAR. ....	63
FIGURA 12 – COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE TRATAMENTO REALIZADA ATRAVÉS DAS MEDIANAS DOS ESCORES DO ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAI ENCONTRADOS.....	63

## RESUMO

Neste estudo, o potencial genotóxico do metilmercúrio, um composto organomercurial altamente tóxico, foi avaliado através do teste do micronúcleo písceo e do ensaio cometa. Exemplares de *Hoplias malabaricus* (Pisces: Erythrinidae) foram expostas ao xenobionte por via trófica, em duas diferentes concentrações (0,075 e 0,75µg/g de metilmercúrio por grama do peixe) durante 60 dias, a cada 96 horas. Além da realização do teste do micronúcleo písceo em coloração convencional (Giemsa), foi aplicada também a técnica de coloração fluorescente com laranja de acridina. Esta técnica foi aplicada com o intuito de aumentar a sensibilidade do teste de micronúcleo em eritrócitos de peixes. Para o ensaio cometa, na tentativa de encontrarmos alguns danos em outros tecidos que não somente no tecido sanguíneo, foi realizado além do ensaio cometa em eritrócitos, o ensaio cometa em células renais. Como resultado, observou-se que o teste do micronúcleo com coloração convencional (Giemsa) não mostrou diferenças significativas com relação ao grupo controle. Já o teste do micronúcleo písceo que utilizou a coloração fluorescente, também não mostrou diferença significativa entre os grupos, porém, apresentou um decréscimo entre as frequências de eritrócitos imaturos dos grupos tratados com metilmercúrio, com relação ao grupo controle. O ensaio cometa realizado para as células do sistema eritrocitário, apresentou resultados significativos entre os grupos controle e contaminados, porém não evidenciando diferenças significativas entre os grupos contaminados. Diferentemente mostraram-se os resultados do ensaio cometa das células renais, que não evidenciaram resultados significativos para este tecido, provavelmente devido ao tipo de dano causado pelo xenobionte estar mais relacionado com os tecidos de maior contato com o mesmo, bem como o seu modo de ação e a cadeia de bioacumulação dentro dos organismos.

## ABSTRACT

In this study, the genotoxic potential of methylmercury, a highly toxic organomercurial compound, was evaluated by testing the piscine micronucleus test and the comet. Specimens of *Hoplias malabaricus* (Pisces: Erythrinidae) were exposed to via ingestion xenobionte, in two different concentrations (0.075 and 0.75 g / g of methylmercury per gram of fish) for 60 days, every 96 hours. In addition to the completion of the micronucleus test in piscine conventional staining (Giemsa) was also carried out the technique of fluorescent staining of acridine orange. This technique was performed in order to increase the sensitivity of the micronucleus test in erythrocytes of fish. To test the comet, trying to find some damage in other tissues not only in tissue blood, was beyond the comet assay in erythrocytes, the comet assay in kidney cells. As a result, it was observed that the micronucleus test with conventional staining (Giemsa) showed no significant differences with the control group. But the piscine micronucleus test of which used the fluorescent staining, no significant difference between groups, however, showed a decrease between the frequencies of immature red cells of groups treated with methylmercury, with the control group. The comet assay performed for the cells of the erythrocyte, showed significant results between groups control and contaminated, but not showing significant differences between groups contaminated. Unlike showed the results of the comet assay of kidney cells, which did not show significant results for this tissue, probably due to the type of damage caused by toxic compound, are more related to the tissues of most contact with it, and its mode of chain of action and bioaccumulation within organisms.

## SUMÁRIO

LISTAS DE SIGLAS .....	VII
LISTA DE SÍMBOLOS.....	VIII
LISTA DE TABELAS .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT .....	XIII
1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1. ESTUDOS SOBRE CITOTOXICIDADE .....	15
1.2. METAIS PESADOS!?	21
1.3. O METILMERCÚRIO .....	25
1.4. ASPECTOS SISTEMÁTICOS E ECOLÓGICOS DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> .	33
1.5. TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO .....	36
1.6. ENSAIO COMETA .....	41
2. OBJETIVOS .....	46
2.1. <i>Objetivo geral</i> .....	46
2.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	46
3. ARTIGO.....	47
3.1 <i>INTRODUÇÃO</i> .....	48
3.2 <i>MATERIAL E MÉTODOS</i> .....	50
3.3 <i>RESULTADOS</i> .....	54
3.4 <i>DISCUSSÃO</i> .....	63
4. CONCLUSÕES .....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72
ANEXO I.....	82
<i>Metodologia</i> .....	82
ANEXO II.....	86
<i>Guide for Authors - Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis</i> .....	86
APÊNDICES.....	92

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ESTUDOS SOBRE CITOTOXICIDADE

O ambiente aquático é um dos ecossistemas que mais sofre impactos causados pela ação antropogênica, uma vez que constituem os compartimentos finais de vários produtos gerados através da atividade humana. Os despejos de esgotos industriais e domésticos, juntamente com a grande quantidade de agrotóxicos utilizada na agricultura, bem como o crescente número de acidentes que envolvem o derrame de derivados do petróleo, contribuem de algum modo para a geração de produtos persistentes que afetam este ecossistema (AKAISHI, 2003).

Deste modo, nas últimas décadas têm aumentado o interesse da comunidade científica, bem como das agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle aos agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas. Esse interesse aumentou devido ao fato de que após a Revolução Industrial, a capacidade de produção e de combinação de diversos elementos químicos entre si, para diversos fins, aumentou exponencialmente (FERRARO, 2003).

Dentre as diferentes substâncias químicas produzidas atualmente pela humanidade, apenas uma pequena parcela destas tem sido estudada quanto aos seus possíveis efeitos nos seres vivos. Com tantas dessas substâncias chegando ao ambiente, principalmente no ambiente aquático, onde, comumente, elas mais se concentram, existe uma grande possibilidade de que estas substâncias estejam se fixando nos indivíduos que compõem as cadeias alimentares (FERRARO, 2003).

A preocupação em se preservar e manter a qualidade do ecossistema aquático está em contínuo crescimento e para tanto, vários estudos têm sido realizados com o intuito de compreender como agem os elementos e as substâncias químicas nestes ecossistemas, bem como suas interações com os seres vivos e seus efeitos sobre estes, além de quanto tempo permanecem no ambiente e quais seriam seus possíveis destinos (AKAISHI, 2003).

Águas e sedimentos podem ter sua genotoxicidade testada em condições laboratoriais usando sistemas biológicos como bactérias, leveduras, roedores e plantas, bem como cultura de células de mamíferos, tendo seus resultados extrapolados para outros organismos (HAYASHI *et al.*, 1998). Entretanto, muitas

vezes a extrapolação não é válida, pois apresenta falhas, devido provavelmente à simplicidade estrutural e metabólica de alguns organismos de estudo, bem como a algumas diferenças características de cada espécie. Os interesses também têm sido focados em testes de laboratório usando organismos aquáticos como, por exemplo, anfíbios, moluscos e peixes (MINISSI *et al.*, 1996).

Conseqüentemente, os estudos sobre a citotoxicidade de substâncias e elementos químicos, se revestem de grande importância, pois permitem determinar as respostas de um dado organismo à contaminação por estes, bem como avaliar o impacto e o efeito destes sobre células, tecidos e órgãos, e ainda inferir sobre possíveis perturbações metabólicas (PANDRANGI *et al.*, 1995). Os padrões de acumulação de xenobióticos são distintos para diferentes organismos e dependem do balanço entre a taxa de assimilação e as taxas de metabolização e eliminação dos compostos químicos.

Desta maneira, os peixes são organismos que fornecem um modelo adequado para o monitoramento da genotoxicidade aquática e da qualidade das águas residuais, devido à sua capacidade de metabolizar xenobióticos e acumular poluentes (GRISÓLIA; CORDEIRO, 2000). Além disso, os peixes atuam em diversos níveis da cadeia trófica, respondem à presença de mutágenos em baixas concentrações, além de serem capazes de ativar o sistema enzimático do citocromo P450. Este sistema enzimático é composto por enzimas monooxigenases, com grupo heme, responsável pelo metabolismo oxidativo de compostos lipofílicos de origem endógena e exógena, como por exemplo, hormônios esteróides ou poluentes ambientais (GOKSOYR *et al.*, 1991, MINISSI *et al.*, 1996). Estas enzimas desempenham um papel fundamental no metabolismo de substâncias xenobióticas e de compostos endógenos (GOKSOYR *et al.*, 1991).

Assim, os peixes são escolhidos como organismos bioindicadores, ou seja, espécies sentinelas que serão utilizadas como primeiros indicadores de efeito do estresse causado por contaminantes nos mais altos níveis de organização entre os seres vivos (ADAMS, 2002). Um bioindicador é definido como sendo um organismo capaz de dar informações sobre as condições ambientais de seu habitat, por sua presença ou ausência, ou pelo seu comportamento, e como um indicador ecológico, como um parâmetro do ecossistema, descrevendo a estrutura e o funcionamento dos mesmos (VAN DER OOST *et al.*, 2003).



Um bioindicador ideal deve sobreviver em ambientes saudáveis, mas também apresentar uma resistência relativa aos contaminantes a que está exposto. Além disso, é importante que esse organismo represente um nível trófico superior da cadeia alimentar. Outros aspectos do bioindicador que podem facilitar o desenvolvimento de um estudo é a abundância dessa espécie no ambiente, bem como a facilidade em adaptar-se aos ensaios de laboratório (AKAISHI, 2003).

Dentre as plantas ou vertebrados escolhidos como bioindicadores, para os ensaios de mutagenicidade e/ou genotoxicidade, o uso de organismos endêmicos como sentinelas ambientais será sempre preferível ao uso de espécies exóticas. Entretanto para que este objetivo seja alcançado de maneira eficiente, o organismo endêmico eleito para este fim deve ser submetido a ensaios suficientemente sensíveis com a finalidade de ser estabelecido um padrão de resposta aos agentes genotóxicos (PANDRANGI *et al.*, 1995).

O impacto de materiais tóxicos na integridade e no funcionamento do DNA da célula dos indivíduos bioindicadores tem sido muito investigado, sob diferentes condições (McCARTHY e SHUGART, 1990). Muitos dos poluentes quando liberados para o ambiente aquático, não só afetam a fisiologia e a sobrevivência dos organismos, mas também têm potencial para interagir com o seu DNA. Essa interação freqüentemente resulta no desenvolvimento de tumores e/ou mutações genéticas (PANDRANGI *et al.*, 1995).

Os primeiros efeitos são tipicamente detectados através de um exame direto dos organismos expostos. Os efeitos das mutações, no entanto, podem não se manifestar por certo número de gerações, mas quando o forem, eles podem ter um efeito significativo sobre a população, já que muitas mutações afetam seriamente o valor adaptativo dos organismos (PANDRANGI *et al.*, 1995).

Para tanto, a utilização de biomarcadores faz-se necessária. Biomarcadores são definidos como as medições em fluidos corporais, tecidos ou células de origem que indicam a presença de modificações celulares ou bioquímicas, devido à presença e magnitude dos poluentes, ou em resposta a algum hospedeiro.

Segundo VAN DER OOST *et al.* (2003), biomarcadores podem ser classificados como:

(1) Biomarcadores de efeito, que constituem parâmetros mensuráveis em compartimentos celulares que permitem inferir efeitos prejudiciais ou adversos aos

organismos; como a indução das enzimas CYP1A1 e CYP1A2 do citocromo P450 na presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

(2) Biomarcadores de exposição, através dos quais é possível detectar e/ou quantificar a presença do xenobionte, seus metabólitos ou sua associação a componentes celulares ou moleculares do organismo; como a detecção de metabólitos na bile em animais expostos a HPAs.

(3) Biomarcadores de susceptibilidade, que indicam uma herança ou uma habilidade adquirida de um organismo em resposta a um desafio de uma exposição a um xenobionte específico, incluindo fatores genéticos e mudanças em receptores que alteram a susceptibilidade de um organismo à exposição.

Os biomarcadores são considerados uma ferramenta indispensável nos programas de monitoramento, pois apresentam características altamente importantes, como por exemplo, grande susceptibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (STEGEMAN *et al.*, 1992; BAINY, 1993). A análise desses parâmetros permite que ocorra: (1) uma detecção precoce da existência de contaminação por substâncias tóxicas e biologicamente significativas, (2) identificação de espécies ou populações em risco de contaminação, (3) magnitude da contaminação e, o que é mais importante, (4) determinação do grau de severidade dos efeitos causados pelos compostos xenobióticos (STEGEMAN *et al.*, 1992).

Entre as várias características que devemos considerar quanto à utilização de biomarcadores, estão o grau de especificidade e de sensibilidade do biomarcador com relação ao xenobionte, a variabilidade e a escala de tempo da resposta, bem como a relevância ecológica (ADAMS, 2002). Para uma melhor compreensão do que acontece com uma população que está sendo afetada por um ou vários contaminantes, deve-se primeiro entender os mecanismos básicos da ação destes em nível de organismo e de suborganismo. Isso poderia ser viabilizado através da utilização de biomarcadores genéticos, a partir dos quais se torna possível entender melhor os efeitos dos contaminantes no indivíduo, transpondo os dados para a população ou comunidade (AKAISHI, 2003).

No entanto, a grande discussão encontra-se no fato de que através do uso de biomarcadores pode-se encontrar uma grande variação de resposta, devido à variabilidade existente entre os indivíduos de uma mesma espécie. Além disso,

certas respostas estabelecidas para uma espécie, não são necessariamente válidas para outras espécies (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Muitos biomarcadores genéticos têm sido utilizados como ferramentas para a detecção de exposição e para avaliação dos efeitos de poluição. Esses biomarcadores incluem testes como avaliação de aberrações cromossômicas, adutos de DNA, quebras no DNA e análise da frequência de micronúcleo e outras alterações nucleares (BOMBAIL, GORDON, BATTY, 2001). Além do que, as análises desses elementos e seus efeitos sobre o material genético são importantes na avaliação de seu papel mutagênico e/ou carcinogênico e ainda seus possíveis efeitos sobre as populações, uma vez que estas substâncias podem atuar de maneira a diminuir a variabilidade genética da população (PANDRANGI *et al.*, 1995).

Para se conhecer a ação tóxica dos xenobiontes, pode-se trabalhar com experimentos laboratoriais, que utilizam bioensaios, ou estudos de campo, chamados de biomonitoramento. Estes permitem enfoques diversos como à obtenção de dados e a padronização de metodologias que possam prever ou avaliar determinado efeito; e o acompanhamento dos efeitos obtidos diretamente de um local impactado. Apesar de serem complementares, deve-se tomar cuidado com a validação dos resultados gerados em laboratório, antes de relacioná-los ao ambiente natural (AKAISHI, 2003).

O uso de bioensaios em estudos de toxicologia é interessante, pois permitem o estudo dos efeitos tóxicos de determinados contaminantes nos organismos de forma isolada ou associados, minimizando a influência das variáveis ambientais e possibilitando o estudo da especificidade relativa de alguns efeitos com os contaminantes. Por outro lado, os resultados obtidos através de bioensaios não podem ser extrapolados diretamente para o ambiente, mas podem cooperar com uma base de dados que venham a ajudar a entender os fatores que estão interferindo na saúde dos organismos, e/ou alterando as condições do próprio ambiente em que vivem. Desse modo, os estudos de áreas impactadas juntamente com bioensaios geram dados para a toxicologia ambiental, permitindo uma melhor avaliação de áreas impactadas (AKAISHI, 2003).

Ensaio com animais vivos possibilitam várias vias de administração da substância em estudo, quer seja através de alimentos, da água ou até mesmo, injetando-se no animal. Podemos ainda avaliar seus efeitos em órgãos ou tecidos específicos, em células germinativas ou somáticas, assim como diferenças entre

contaminações crônicas ou agudas. Estas possibilidades de comparações podem nos fornecer uma gama de resultados que reproduzem, o mais próximo possível, as condições de uma exposição dos seres humanos a estas substâncias (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991).

Deve-se ressaltar ainda que, devido à variedade de possíveis efeitos de um xenobionte, um teste isolado não é suficiente para avaliar a atuação deste sobre um ser vivo. Também se deve considerar que os efeitos encontrados podem ficar restritos a espécie estudada, bem como aos efeitos sinérgicos e antagônicos com outras substâncias disponíveis no meio (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991).

## 1.2. METAIS PESADOS !?

O termo metal pesado tem sido freqüentemente utilizado como o nome de um grupo que inclui os metais e os semimetais (metalóides) que estariam relacionados com toxicidade e ecotoxicidade. Mas, este é apenas um dos conceitos utilizados até hoje, principalmente nas duas últimas décadas. Para efeitos de regulamentação jurídica, cada instituição/órgão especifica uma lista de elementos para qual o termo é empregado. Entretanto, muitas vezes, essas listas são diferentes de um grupo de regulamentos para outro, ou ainda pode não haver clareza em quais elementos seriam cobertos pelo termo. Nestes casos, há uma confusão quanto ao significado do termo. Esta confusão prejudica qualquer tipo de discussão que esteja relacionada ao assunto (DUFFUS, 2002).

Além disso, o termo metal pesado é freqüentemente relacionado com situações de toxicidade e poluição, causando um grande número de equívocos quanto o seu significado. O termo “metal” em seu uso convencional refere-se ao elemento puro ou a uma liga de elementos metálicos e o termo “pesado”, em seu uso convencional, implica em alta densidade. O conhecimento das densidades dos metais de suas ligas é pouco informativo do ponto de vista biológico, pois, muitas vezes, não são estas as espécies reativas com as quais os seres vivos interagem (DUFFUS, 2002).

DUFFUS (2002) revisa em seu trabalho um grande número de definições para o termo metal pesado, levando em consideração características químicas importantes, como densidade, massa atômica, número atômico, propriedades químicas, bem como definições que levam em consideração a toxicidade dos elementos. Existe também uma tendência em se afirmar que todos os chamados metais pesados possuem propriedades altamente tóxicas e/ou ecotóxicas (DUFFUS, 2002). É importante ressaltar que alguns desses elementos citados como metais pesados, são necessários em quantidades mínimas para o correto funcionamento dos seres vivos, como cofatores em vias metabólicas (SANCHEZ-GALAN *et al.*, 1999), por exemplo, enquanto outros não desempenham um papel tão importante na vida dos organismos, até onde se sabe.

Assim, como o cobre, o zinco e o ferro, por exemplo, são considerados elementos essenciais à vida e não são agentes tóxicos, quando estes se encontram nas células em quantidades que excedem as quantidades necessárias para o

metabolismo celular, os mesmos metais podem adquirir uma propriedade tóxica (SANCHEZ-GALAN *et al.*, 1999). Portanto, o termo tóxico, atribuído aos metais pesados deve ser utilizado com cautela, já que podem existir diferentes situações de contaminação por esses elementos.

Sabe-se que muitos metais pesados apresentam uma grande afinidade pelos grupos SH das proteínas, muitas vezes causando o impedimento da formação de pontes dissulfeto (-S-S-), podendo assim inutilizar certas enzimas. Neste caso, nenhum mecanismo de ação foi completamente elucidado (HARTWIG, 1998). Os metais pesados podem ainda interagir com o grupo ácido carboxílico (-COOH) e amino (-NH<sub>2</sub>), nas extremidades das cadeias protéicas (HARTWIG, 1998).

Ainda em relação à toxicidade dos metais pesados, deve-se considerar ainda que a presença e a biodisponibilidade, de dois ou mais deles no ambiente, pode estabelecer dois a dois, casos de antagonismo e sinergismo, estes relacionados a fatores como tempo de exposição, efeitos deletérios para indivíduos ou populações e taxas de absorção, acúmulo e detoxificação (WREN *et al.*, 1995; WIENER *et al.*, 1996).

Torna-se necessário então rever o uso que tem sido proposto para o termo, com especial atenção à sua relação com a química fundamental. Sem cuidados com os fundamentos científicos, o pensamento confuso torna susceptível o avanço do conhecimento científico e leva à má legislação e à generalidade nas tomadas de decisões dos órgãos regulamentadores (DUFFUS, 2002).

De acordo com a USEPA (United States Environmental Protection Agency) os metais pesados seriam aqueles elementos metálicos com altos pesos atômicos (como por exemplo, Hg, Cr, Cd, Ar e Pb), que podem ser danosos aos organismos vivos quando em baixas concentrações e tendem a se acumular nas cadeias alimentares.

Já para o Department of Labor dos Estados Unidos, que possui uma divisão chamada OSHA, os metais pesados estão incluídos no grupo dos metais tóxicos, responsáveis por afetar negativamente a saúde das pessoas, de forma individual ou formando compostos metálicos. Estes compostos podem acumular em sistemas biológicos e tornarem-se significativamente perigosos para a saúde. A resolução ainda discute neste tópico sobre os metais, alguns elementos que considera elementos semimetálicos, incluindo Ar e Se.

Para DE VRIES (2002), os metais pesados são os elementos que possuem alta densidade e que grande parte pertence ao grupo de transição da tabela periódica. A maioria destes metais é também chamada de oligoelementos, salientando a sua relativa abundância nos solos. Os elementos que são geralmente considerados incluem o Ar, Cd, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, Se, Zn e Vn.

De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), em sua divisão de monitoramento de ecossistemas terrestres (TEMS), a definição de metais pesados estaria relacionada aos metais que possuem densidade maior que cinco. Esta definição inclui os elementos Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e Zn.

A definição e posterior categorização dos elementos permitem uma rápida visualização das características que estes possuem em comum. Isso acontece para algumas substâncias, com exceção dos metais. Embora estes possuam propriedades em comum, cada um é um elemento distinto com suas próprias características físico-químicas que determina suas propriedades biológicas e toxicológicas e como estes elementos podem circular pelo ambiente (DUFFUS, 2002).

Muitos autores definiram metais pesados de forma diversa, alguns estabelecendo que sua densidade fosse maior que quatro, outros maiores que cinco e outros ainda, maior que seis. No entanto, as definições baseadas na sua densidade não possuem uma grande significância quanto a sua reatividade. Nenhuma relação pode ser encontrada entre a densidade ou outros conceitos físico-químicos usados para definir metais pesados e sua capacidade toxicológica ou de dano ao meio ambiente atribuída aos mesmos (DUFFUS, 2002).

Compreender a biodisponibilidade, a qual depende de parâmetros biológicos e de parâmetros físico-químicos do metal, é o caminho para averiguarmos o potencial toxicológico dele e de seus compostos. No entanto, ao adotarmos estes parâmetros, eles são dependentes da estrutura atômica, a qual por sua vez é dependente de sua posição na tabela periódica dos elementos. Desta forma, qualquer classificação de cunho científico deve ser necessariamente baseada nesta tabela ou em alguma subdivisão desta (DUFFUS, 2002).

Pela sua incoerência científica, o termo metal pesado, deve ser abandonado. Uma classificação dos metais e de seus compostos firmemente baseada nas suas propriedades químicas se faz necessária. Esta classificação permitiria uma

interpretação das bases bioquímicas da toxicidade, bem como forneceria uma base de dados racional para se determinar quais compostos metálicos seriam mais susceptíveis de serem mais tóxicos (DUFFUS, 2002).

No entanto, não devemos nos esquecer de outra incoerência presente em muitos trabalhos, a qual está relacionada com a palavra metal. Esta é comumente empregada e usada tanto para o metal em si como para seus compostos. Deve-se ao usar o termo metal, distinguir, por exemplo, o sódio metal do cloreto de sódio. Ou ainda, cromo, usado sem problemas em próteses médicas e odontológicas diferir dos cromatos, que são identificados como carcinogênicos (DUFFUS, 2002).

Desta forma, uma classificação sensata de um elemento químico, quanto a sua toxicidade, deve ser feita separadamente do metal e seus compostos, de acordo com suas propriedades químicas, biológicas e toxicológicas próprias (DUFFUS, 2002).



### 1.3. O METILMERCÚRIO

O histórico da produção de mercúrio tem sido substancial e as perdas para o ambiente representam um dado ainda mais alarmante. Durante a corrida do ouro nos Estados Unidos, mais precisamente no estado da Califórnia, entre 1840 e 1850, o mercúrio foi largamente utilizado para ajudar a separar o ouro a partir do seu minério. Estima-se que mais de 50 milhões de libras de mercúrio foram utilizadas para obter ouro em Serra Nevada. Conseqüentemente, este mercúrio foi descarregado nos córregos e rios que drenam para os outros rios da Califórnia (WREN *et al.*, 1995).

As preocupações com a saúde relacionadas com contaminações ambientais foram associadas com contaminação por metilmercúrio começou em 1956, em Minamata e Niigata no Japão. Na ocasião, a população dessas áreas foi envenenada após o consumo de peixe contaminado por metilmercúrio. A origem do mercúrio foi uma fábrica de cloreto de vinil, mas isso foi descoberto apenas no final da década de 1960. Oficialmente, 2.252 pessoas foram diretamente contaminadas pelo metilmercúrio, sendo que 1.043 óbitos ocorreram e um total de 12.127 pessoas reivindicou ter a doença (BISINOTI; JARDIM, 2004).

Também durante a década de 60, agricultores suecos ficaram preocupados com o grande número de pássaros mortos e o conseqüente desaparecimento de algumas espécies. Posteriormente descobriu-se que o problema estava relacionado com a utilização de sementes tratadas com compostos organomercuriais, utilizados como fungicidas. Nesta mesma década, níveis muito altos de mercúrio foram encontrados em peixes e sedimentos no lago St. Clair, no estado de Ontário, no Canadá, provenientes de efluentes de indústrias de cloro-álcali e de papel e celulose. Neste caso, a pesca esportiva e comercial foi proibida, bem como a utilização de mercúrio nessas indústrias, apesar de não ter ocorrido uma contaminação generalizada (WREN *et al.*, 1995). O enfoque científico e regulamentar em matéria de mercúrio nos ecossistemas aquáticos tem sido em grande parte motivada, desde então, pelo risco à saúde causado pelo consumo de peixe contaminado, porque a exposição humana ao metilmercúrio é quase totalmente devida ao consumo de peixe (WIENER *et al.*, 1996).

O mercúrio é um metal pertencente ao grupo II B da tabela periódica, junto com o cádmio e o zinco, e pode existir em três estados de oxidação estáveis:

mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ), íon mercuroso ( $\text{Hg}_2^{+2}$ ) e íon mercúrico ( $\text{Hg}^{+2}$ ). Além disso, o elemento é caracterizado por baixa resistividade elétrica, alta tensão superficial e alta condutividade térmica. Descoberto pelos fenícios em 700 a.C., seu símbolo é Hg devido ao nome grego Hydrargyrum, que significa prata líquida, por se apresentar na forma líquida a 24°C (WREN *et al.*, 1995). De todos os seus isótopos encontrados na natureza, apenas sete são estáveis. Os isótopos de peso atômico 202, 200 e 199 representam 70% de todo o mercúrio na natureza (OLIVEIRA RIBEIRO, 1997).

Os antigos faziam uso terapêutico do mercúrio, desconhecendo seus efeitos tóxicos. A medicina assíria, entre 668 a.C. e 626 a.C., no tempo do rei Assurbanípal, usava compostos de mercúrio para tratar os males dos olhos, ouvidos, pulmões e intestinos e também para forçar contrações uterinas em partos difíceis. Os chineses acreditavam que o mercúrio tinha propriedade medicamentosa para prolongar a vida. Já os hindus pensavam que o mercúrio possuía propriedades afrodisíacas. Depois de Cristo, na Grécia, o mercúrio foi usado como ungüento medicinal. Os romanos, então, utilizaram como componente de ungüentos ou pomadas para o tratamento de diversas doenças de pele, e também em cosméticos, mas logo perceberam que apresentava perigos à saúde e à vida (AZEVEDO, 2003).

O mercúrio ocorre normalmente, em pequenas concentrações, nos vários compartimentos da natureza: hidrosfera, litosfera, atmosfera e biosfera. Entre esses compartimentos há um contínuo fluxo de mercúrio (AZEVEDO, 2003). O mercúrio pode existir nestes compartimentos sob diversas formas físicas e químicas, responsáveis pelo seu controle de comportamento, cujas conversões tornam bastante complexa sua distribuição ambiental. Os depósitos de mercúrio podem ocorrer em qualquer tipo de rocha (ígneas, sedimentares e metamórficas). A maior fonte de mercúrio atmosférico é o desgaste natural da crosta terrestre, que soma de 2.700 a 6.000 toneladas por ano. Também podem ser encontrados na atmosfera vapores de mercúrio metálico ou compostos mercuriais orgânicos, sendo as principais fontes o meio terrestre, tais como a evapotranspiração das folhas, o decaimento da vegetação e a degasificação dos sólidos (BEZERRA, 1990).

Um estudo realizado por BOENING (2000) sobre os efeitos ecológicos, o transporte e o destino dos compostos mercuriais, revelou que há dois ciclos de transporte e distribuição do mercúrio: um global e outro local. Além disso, o autor explica que estes dois ciclos ainda não são totalmente compreendidos, porém envolveriam a circulação atmosférica do dimetilmercúrio formado por meio da ação

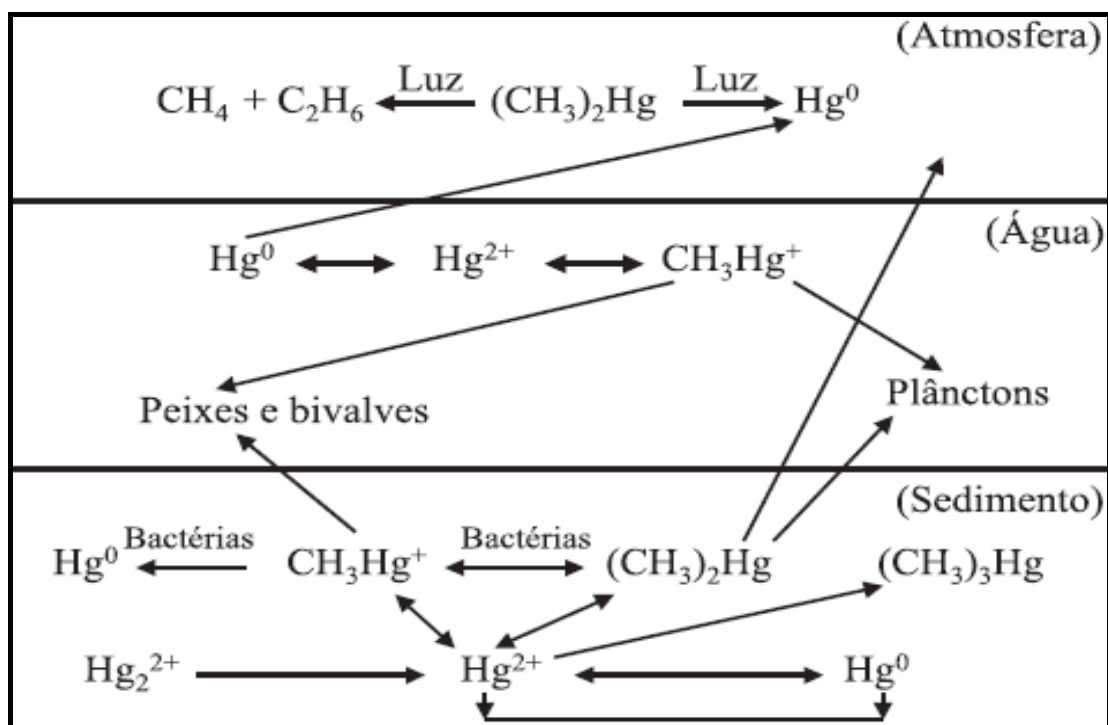
bacteriana. Assim, os níveis de metilmercúrio dependeriam do balanço entre a metilação e a desmetilação bacterianas.

O ciclo global do mercúrio envolve a emissão de  $\text{Hg}^0$  (forma inorgânica) das superfícies da terra e da água para a atmosfera, o transporte de  $\text{Hg}^0$  na atmosfera em escala global, a possível conversão em espécies solúveis não identificadas, e retorno a terra e à água por vários processos deposicionais. Essas formas não se acumulam em cadeias alimentares, exceto em fungos. A mudança da forma inorgânica para a metilada é o primeiro e mais crucial passo no processo de bioacumulação aquática deste elemento (WHO, 1990).

Ao formar complexos estruturais com sulfetos, o mercúrio precipita na forma de  $\text{HgS}$ , formando um composto chamado cinábrio, o qual foi utilizado como tinta antes de se descobrir seu processo de refinamento e a conseqüente extração do mercúrio. O cinábrio apresenta cor avermelhada, com uma estrutura cristalina hexagonal, formada por cadeias em espiral de átomos de - S-Hg-S -, constituindo a forma mais estável do mercúrio na natureza (OLIVEIRA RIBEIRO, 1997). A derradeira deposição de mercúrio, provavelmente como cinábrio, acredita-se que ocorra nos sedimentos oceânicos. Parte do mercúrio inorgânico emitido oxida-se para  $\text{Hg}^{2+}$  e, em seguida, é metilado ou em outras vias é transformado nas formas organomercuriais (WHO, 2000) (FIGURA 1).

A natureza tóxica do mercúrio, sua acumulação nos seres vivos e seu deslocamento através da cadeia alimentar atestam sua importância para a biosfera e principalmente para os ecossistemas aquáticos, sendo os compostos organomercuriais muito mais tóxicos do que o mercúrio inorgânico (BOENING, 2000; ATSDR, 2003).

FIGURA 1 - CICLO DO MERCÚRIO EM AMBIENTES NATURAIS.



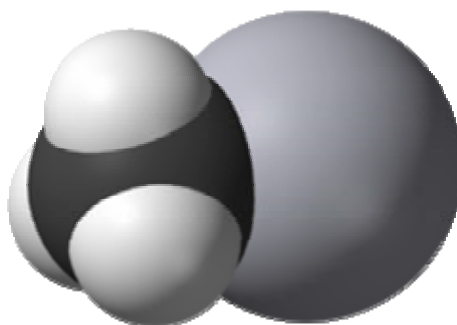
FONTE: BISINOTI; JARDIM, 2004.

A ameaça então, associada à poluição por mercúrio provém do fato de que algumas bactérias têm a capacidade de converter substâncias inorgânicas contendo mercúrio em cloreto de metilmercúrio e em dimetilmercúrio (substâncias orgânicas), através de uma reação de metilação (AZEVEDO, 2003). A metilação acredita-se que envolva uma reação não enzimática entre  $\text{Hg}^{2+}$  e a metilcobalamina (também conhecida como um análogo da vitamina  $\text{B}_{12}$ ), um composto que pode estar disponível em quantidades significativas no ambiente, porque é uma coenzima produzida pelas bactérias tanto aeróbias quanto anaeróbias, sendo predominante na primeira. Este composto é capaz de transferir o grupo metila para o íon  $\text{Hg}^{2+}$ . Neste caso, ocorre a transferência do grupo metila como um íon carbânion e um radical metil, para produzir o  $\text{CH}_3\text{Hg}$  e o  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$  em condições tanto aeróbias quanto anaeróbias (BISINOTI; JARDIM, 2004; WHO, 2000).

As bactérias da flora intestinal de diversas espécies animais, incluindo os peixes, também são capazes de converter compostos iônicos de mercúrio em metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) (FIGURA 2), embora em muito menor grau. O metilmercúrio é rapidamente acumulado pelos peixes e mamíferos marinhos e atinge suas mais

altas concentrações nas grandes espécies predadoras no topo da cadeia alimentar aquática (WREN *et al.*, 1995; WIENER *et al.*, 1996; WHO, 2000). Certos microorganismos podem desmetilar  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , outros podem reduzir  $\text{Hg}^{2+}$  para  $\text{Hg}^0$ . Assim, acredita-se que os microorganismos tenham um papel importante no destino do mercúrio do meio ambiente e, conseqüentemente, à exposição humana (WHO, 2000).

FIGURA 2 – MODELO MOLECULAR EM 3D DO CÁTION DE METILMERCÚRIO. A ESFERA MAIOR E CINZA REPRESENTA A MOLÉCULA DE Hg E A ESFERA MENOR E PRETA REPRESENTA A MOLÉCULA DE CARBONO, LIGADA A TRÊS ESFERAS CLARAS MENORES, REPRESENTANDO AS MOLÉCULAS DE HIDROGÊNIO



FONTE: WIKIPÉDIA

A maioria dos compostos orgânicos do mercúrio é solúvel em água. A solubilidade do mercúrio na água varia muito e depende da natureza aniônica do composto (WHO, 1990). WHO (1990) descreve que os vapores de metilmercúrio são mais solúveis no plasma, sangue total e hemoglobina que em água destilada ou solução salina isotônica. As solubilidades em água dos compostos de mercúrio aumentam na seguinte ordem: mercúrio elementar < cloreto mercurioso < cloreto de metilmercúrio < cloreto de mercúrio. As formas inorgânicas são geralmente menos tóxicas do que compostos orgânicos, porém, dentro das formas inorgânicas, a toxicidade aumenta conforme aumenta a solubilidade em água (WREN *et al.*, 1995).

As algas possuem concentração de mercúrio muito maior do que as águas em que se desenvolveram. Os pequenos crustáceos que se alimentam das algas apenas apresentam concentrações maiores, e os peixes, por sua vez, que se alimentam desses crustáceos possuem concentrações ainda maiores. Um aumento de cerca de 100.000 vezes na concentração do mercúrio foi observado ao longo

dessa cadeia alimentar (RICHEY; GLENN, 1986; BOENING, 2000). Peixes marinhos e crustáceos, que constituem importante fonte de proteínas em muitos países, se apresentaram contaminados com altas concentrações de metilmercúrio em estudos realizados pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1990). Bioacumulação de metilmercúrio em peixes depende do nível trófico, idade ou comprimento do peixe. Além disso, alguns peixes podem apresentar altos níveis de metilmercúrio devido à biomagnificação (CASTRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2008). Dessa forma, peixes também são úteis podendo agir como organismos sentinela para indicar o potencial para exposição de populações humanas a substâncias genotóxicas presentes na água.

A meia-vida biológica de metilmercúrio em seres humanos é de aproximadamente 65 dias. A absorção gastrointestinal do metilmercúrio é da ordem dos 90-95%. O metilmercúrio é absorvido, transportado para os glóbulos vermelhos e é amplamente distribuído para todo o corpo; então é excretado na urina e nas fezes. Todas as formas de mercúrio são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica existente entre a placenta e o feto. Na verdade, o cérebro do feto é mais suscetível aos danos induzidos pelo mercúrio do que o cérebro adulto. Em adultos, metilmercúrio possui latência de 1 mês ou mais depois de uma exposição aguda e os principais sintomas relacionados com a exposição ao mesmo estão relacionados com a intoxicação do sistema nervoso, representados pelas parestesias e dormências nas mãos e nos pés, as dificuldades de coordenação e dificuldades de constrição do campo visual, sintomas auditivos, isquemia cerebral, demência e depressão. Além disso, o metilmercúrio pode causar ainda nefrotoxicidade, toxicidade gastrointestinal e hemorragias (CASTRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

Em uma extensa revisão sobre a genotoxicidade dos compostos do mercúrio, DE FLORA *et al.* (1994) fez uma avaliação global da literatura disponível e encontrou dados excessivamente complexos e de difícil interpretação. Entretanto, descrevem em seu trabalho algumas conclusões de fundamental importância. Os compostos inorgânicos não conseguiram induzir mutações pontuais em bactérias, mas exerceram uma ação direta sobre os cromossomos resultando em efeitos clastogênicos, sobretudo em determinados sistemas em eucariotos. Os danos mais comuns produzidos pelo mercúrio, no nível genético, foram as perturbações das fibras do fuso mitótico, devido à sua elevada afinidade para com os grupos sulfidríla, contidos nas proteínas que formam estas fibras. Os compostos orgânicos de mercúrio mostraram-se ainda mais fortes do que a colchicina, substância conhecida

como inibidora das fibras do fuso, mas, em desacordo com a mesma, doses subletais produziram uma transição gradual para C-mitose. C-mitose é a divisão desigual dos cromossomos nas células filhas e neste caso, os compostos orgânicos mostraram-se mais potentes do que a colchicina para a produção desse efeito, que pode resultar em aneuploidia e/ou poliploidia.

Os principais mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade do metilmercúrio são a inibição da síntese protéica, desorganização dos microtúbulos, aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular com perturbação das funções dos neurotransmissores, principalmente devido à ligação do metilmercúrio com os grupos tióis e sulfidrilas. O mercúrio intracelular, por conseguinte, atribui-se a resíduos tiólicos de proteínas resultando em ativação de enxofre e blocos enzimas relacionadas, cofatores e hormônios. Também a superprodução de radicais livres pode resultar de interações indiretas do metilmercúrio em sítios celulares críticos ou como conseqüências da inibição dos mecanismos protetores. A formação de espécies reativas de oxigênio no rim, fígado e cérebro, foi observada após a administração de cloreto de metilmercúrio em roedores, peixes e em células *in vitro* (CASTRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

O metilmercúrio é capaz de induzir perturbações em proteínas histônicas e influenciar os fatores que regulam a atividade de organização nuclear. O metilmercúrio também interferiu na expressão gênica de cultura *in vitro* de células da glia em baixas concentrações. A indução da não-disjunção e de mutações letais recessivas ligadas ao sexo foi encontrada em *Drosophila melanogaster* tratadas com metilmercúrio. A tolerância ao mercúrio foi relacionada com a percepção do mercúrio e não com a velocidade de excreção (WHO, 1990).

Em uma extensa revisão sobre a genotoxicidade dos compostos do mercúrio, DE FLORA *et al.* (1994) fez uma avaliação global da literatura disponível e encontrou dados excessivamente complexos e de difícil interpretação. Entretanto, descrevem em seu trabalho algumas conclusões de fundamental importância. Os compostos inorgânicos não conseguiram induzir mutações pontuais em bactérias, mas exerceram uma ação direta sobre os cromossomos resultando em efeitos clastogênicos, sobretudo em determinados sistemas em eucariotos. Os danos mais comuns produzidos pelo mercúrio, no nível genético, foram as perturbações das fibras do fuso mitótico, devido à sua elevada afinidade para com os grupos sulfidrilas, contidos nas proteínas que formam estas fibras. Os compostos orgânicos de

mercúrio mostraram-se ainda mais fortes do que a colchicina, substância conhecida como inibidora das fibras do fuso, mas, em desacordo com a mesma, doses subletais produziram uma transição gradual para C-mitose. C-mitose é a divisão desigual dos cromossomos nas células filhas e neste caso, os compostos orgânicos mostraram-se mais potentes do que a colchicina para a produção desse efeito, que pode resultar em aneuploidia e/ou poliploidia.

VERSCHAEVE *et al.* (1985) observaram, por exposição *in vitro* de linfócitos humanos a  $\text{HgCl}_2$  e  $\text{CH}_3\text{HgCl}$ , a ocorrência significativa de efeito clastogênico e de dissociação de cromossomos acrocêntricos, que normalmente encontram-se altamente associados. Os autores afirmam que os efeitos na separação cromossômica não são necessariamente decorrentes da ligação do metal com proteínas do fuso, e que, por exemplo, a ligação e a inativação da RNA polimerase I, pode ser outro mecanismo de ação nociva. Também foi verificada a indução de danos cromossômicos em linfócitos de pessoas expostas ao metilmercúrio através do consumo de peixes contaminados (SKERFVING *et al.*, 1974).

Entretanto, MABILLE *et al.*, 1984 (*apud* AZEVEDO, 2003), em estudo realizado através de linfócitos de sangue periférico de indivíduos do sexo masculino, expostos ocupacionalmente a vapores de mercúrio metálico, não registraram aumento do número de aberrações cromossômicas dessas células. Segundo os autores, a vigilância da exposição de populações com base no exame citogenético de linfócitos do sangue periférico nem sempre representa um bom indicador do dano produzido ao patrimônio genético por um agente químico. A diferença entre esses achados e os de POPESCU *et al.*, 1979 (*apud* AZEVEDO, 2003), talvez se deva à exposição ao mercúrio, posto que as aberrações cromossômicas registradas por esses autores se deram em trabalhadores de indústria de cloro-soda, que exibiam níveis urinários do metal muito superiores, comparativamente.



#### 1.4. ASPECTOS SISTEMÁTICOS E ECOLÓGICOS DE *Hoplias malabaricus*.

FILO – Chordata

SUBFILO – Vertebrata

SUPERCLASSE – Pisces

CLASSE – Osteichthyes

SUBCLASSE – Actinopterygii

INFRACLASSE – Teleostei

SUPERORDEM – Osthariphyi

SÉRIE – Otophyi

SUBSÉRIE – Characiphyi

ORDEM – Characiformes

FAMÍLIA – Erythrinidae

GÊNERO – *Hoplias*

ESPÉCIE: *Hoplias malabaricus*

Uma espécie de peixe teoricamente ideal para avaliar genotoxicidade de um tipo de substância poluente deve obedecer aos seguintes critérios: (1) deve ser difundida em diferentes ecossistemas, cosmopolita se possível, a fim de ser empregada para levantamentos *in situ*; (2) suficientemente sensível para a detecção de genotoxicidade de uma ampla gama de poluentes em baixas doses; (3) deve ser adequada para as condições de cultivo, a fim de realizar experimentos laboratoriais; (4) possuir grandes populações naturais, a fim de impedir predação de indivíduos e não colocar a espécie em risco, ou impedir sua conservação (SANCHEZ-GALAN *et al.*, 1999).

A traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), pertence à ordem Characiformes e à família Erythrinidae, foi a espécie escolhida para participar deste estudo. As espécies da família Erythrinidae ocorrem na América do Sul, apresentando um corpo cilíndrico e nadadeira caudal arredondada. Esta espécie apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em quase todas as bacias da América Central até o Rio Colorado, no sul da Argentina, apresentando diferentes áreas de endemismo.

Como características particulares da espécie podem-se enumerar: a presença de dentes caninos ou cônicos nas maxilas, ausência de nadadeira adiposa e

escamas relativamente largas. A traíra é um peixe de corpo alongado e roliço, que possui uma nadadeira anal com 10 ou 11 raios e nadadeira peitoral com 13 raios, ausência de fontanela, com a linha lateral variando em número de escamas entre 38 e 42, nadadeira dorsal com 14 raios, bem como a presença de uma língua com placas de denticulos, ásperas ao tato. O padrão de coloração corporal é definido por ser irregularmente manchado, com a presença de três a quatro listras na face divergindo do olho para trás. Além disso, apresentam no corpo cinco faixas transversais inconspícuas, um pouco inclinadas, até mesmo nas nadadeiras dorsal, anal e caudal, que apresentam listras escuras alternadas com espaços claros (NELSON, 1994).

Algumas espécies desta família conseguem realizar respiração aérea e são capazes de se mover por trechos de terra entre lagoas, algumas são capazes até mesmo de construir ninhos. Exemplares de *Hoplias macrophtalmus*, por exemplo, podem atingir até um metro de comprimento (NELSON, 1994).

A espécie, *Hoplias malabaricus*, apresenta-se com um comprimento em torno de 50 cm e peso de até 1,5 kg (PLANQUETTE; KEITH; LE BAIL, 1996). A espécie é onívora durante seu primeiro ano de desenvolvimento, com uma dieta que compreende microcrustáceos, algas e insetos aquáticos. Estes indivíduos têm em sua dieta uma média de 75% de insetos e 25% de pequenos peixes (CASTRO; CASATTI, 1997). Após este período (normalmente após alcançarem 12 cm de comprimento), tornam-se estritamente carnívoras e muito especializadas em piscivoria. Os lambaris correspondem a alguns dos alimentos preferenciais, porém, em situações de pouca abundância de presas, as traíras enriquecem a sua dieta com outros itens, como crustáceos, por exemplo. Estas presas alternativas tanto podem ser animais que habitam a coluna de água quanto bentônicos (LOUREIRO, 1995). Há também registros de outros gêneros de preferência, como por exemplo, *Curimata* e *Aequidens* (SOARES; ALMEIDA; TUNK, 1986). Já como os principais predadores das traíras no meio aquático, podemos citar a piranha (*Serrasalmus rhombeus*) e o caparari (*Pseudoplatystoma tigrinum*) (PLANQUETTE; KEITH; LE BAIL, 1996).

Além disso, uma curiosidade relacionada ao hábito predador das traíras é perceptível no movimento de outros peixes ao longo dos rios, que em sua movimentação não são influenciados apenas devido às correntes e à temperatura, mas também devido à presença ou à ausência de predadores naquelas águas

(GILLIAN; FRASER, 2001). Habitam preferencialmente ambientes lânticos, possui comportamento territorialista e hábitos noturnos. Permanecem junto à vegetação durante o dia, saindo para caçar durante a noite.

FIGURA 3 - EXEMPLAR DE *Hoplias malabaricus*, UTILIZADO NO PRESENTE TRABALHO.



Fonte: a autora (2008)

Esta espécie foi escolhida para o presente trabalho por possuir uma ampla distribuição geográfica e ser piscívoro, possuindo assim uma vantagem de poder ser mantido em laboratório e ser alimentado com peixes menores, os quais são devorados em sua totalidade e inteiros, facilitando assim sua exposição aos contaminantes desejados.

### 1.5. TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO

O teste do micronúcleo foi originalmente desenvolvido por SCHMID (1975) para células da medula óssea de camundongos e foi adaptado por HOOFTMAN e RAAT (1982) para o estudo de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratórios. Esta modificação da técnica original passou a ser conhecida como Piscine Micronucleus Test, e é adotado como Teste do Micronúcleo Písceo.

HEDDLE (1973) e SCHMID (1975), independentemente, propuseram um tipo de ensaio que permitiria a avaliação do dano ao DNA pela análise e quantificação de uma estrutura citoplasmática conhecida pelos hematologistas como corpúsculo de Howell-Jolly, os quais são encontrados em populações celulares em divisão. Foram essas estruturas que receberam o nome de micronúcleos. Micronúcleos são cromossomos inteiros ou parciais que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular. Do mesmo modo, podem ocorrer anomalias celulares, formadas quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente uma saliência de cromatina (BOMBAIL *et al.*, 2001). Conseqüentemente, o ensaio detecta tanto os eventos clastogênicos, ou seja, eventos de dano diretamente no cromossomo e seus componentes, notadamente no DNA, como os defeitos no fuso celular e outros componentes envolvidos na formação do fuso, conhecidos como mecanismos aneugênicos (ALBERTINI *et al.*, 2000).

O princípio do teste baseia-se no fato de que, durante o processo de divisão celular, principalmente na anáfase, as cromátides e os fragmentos cromossômicos acêntricos não são transportados pelas fibras do fuso para os pólos opostos, enquanto que os fragmentos com centrômero o são. Após a telófase, os cromossomos sem dano são incluídos no núcleo de cada uma das células filhas. No entanto, alguns elementos, normalmente muito pequenos, não são incluídos nos núcleos formados e permanecem no citoplasma, constituindo as estruturas caracterizadas como micronúcleos (SCHMID, 1975). Evidencia-se que o teste só pode ser realizado com populações de células que tenham a capacidade de entrarem em divisão e preferencialmente que a análise seja feita após um único ciclo

de divisão celular, pois existe a incerteza da permanência destas estruturas por mais de um ciclo de divisão (FENECH, 2000).

Os efeitos de substâncias que provoquem quebras cromossômicas ou ainda afetem os componentes do fuso ou da região centromérica podem ser detectados a partir da presença de micronúcleos. Deve-se ressaltar que nem todos os produtos genotóxicos são clastogênicos, pois muitos induzem à formação dos micronúcleos por sua capacidade de afetarem o fuso (HEDDLE *et al.*, 1991).

São considerados micronúcleos aqueles que são formados e estão visivelmente separados do núcleo principal da célula possuindo um tamanho que corresponde a 1/5 a 1/20 do tamanho deste núcleo e ainda que não ultrapassem em 1/3 o tamanho do núcleo principal. Devem ainda, possuir bordas distinguíveis e com a mesma refração do núcleo principal. No caso específico dos peixes, devido ao tamanho normalmente reduzido dos cromossomos, esta proporção de tamanho passa para a faixa de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo original (AL SABTI; METCALFE, 1995; AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; GUSTAVINO *et al.*, 2001).

Durante o processo de contagem dos micronúcleos, são analisadas entre 1 mil e 2 mil células, com membranas citoplasmáticas e nucleares intactas, não sendo analisadas aquelas que estejam sobrepostas ou danificadas (AL SABTI; METCALFE, 1995). Sendo assim, devemos levar em consideração a ocorrência espontânea de micronúcleos, que no caso dos peixes ocorre em uma taxa basal muito baixa, ocorrendo em uma maior frequência em roedores (cerca de 3%) (WILLIAMS; METCALFE, 1992).

Alguns fatores devem ser levados em consideração ao aplicarmos o ensaio com micronúcleos. O ensaio não é capaz de detectar as não disjunções mitóticas, se estas não levarem à perda cromossômica na anáfase, bem como também não será possível detectar aberrações cromossômicas causadas por rearranjos, tais como translocações ou inversões, se estas não forem capazes de originar fragmentos acêntricos. Conseqüentemente, neste aspecto, o teste apresenta uma subestimativa e falta de sensibilidade (METCALFE, 1989).

A avaliação das alterações nucleares e os micronúcleos têm sido utilizados para estimar o nível de exposição aos contaminantes em muitas pesquisas, principalmente na investigação de efeitos genotóxicos de poluentes ambientais (AL-SABTI, 1986), desde os anos 80. Esse teste mede o dano cromossômico estrutural

ou numérico e tem sido usado para avaliar genotoxicidade, sendo um indicador recomendado para estudos ambientais tanto em condições laboratoriais como no campo (BELPAEME, COOREMAN, KIRSCH-VOLDERS, 1998).

Existem vários ensaios de mutagenicidade e o teste do micronúcleo tem sido aplicado com sucesso por se tratar de um ensaio simples, seguro e sensível, e por não depender da característica cariotípica do animal em estudo (MINISSI *et al.*, 1996). Por estas razões, o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes tem se mostrado uma técnica promissora em investigações de mutagênese com causas ambientais (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Ensaio de micronúcleos em peixes são geralmente realizados com eritrócitos do sangue periférico devido à facilidade do seu uso. Além de eritrócitos, outros tipos de células, como de brânquias e de fígado, também foram usados por diversos autores como uma alternativa (MANNA; SADHUKHAN, 1986).

Para HOSE *et al.* (1987), o teste de micronúcleo písceo revelou-se com grandes potencialidades, por ser de rápida execução, não dispendioso e um excelente indicador da contaminação química dos peixes. HOSE *et al.* (1987), ao analisarem as freqüências de micronúcleos em eritrócitos circulantes de duas espécies de peixes marinhos (*Genyonemus lineatus* e *Paralabrax clathratus*) coletados em regiões poluídas e não poluídas, da região Sul da Califórnia, encontraram freqüências 4 vezes maiores para *Genyonemus lineatus* e 11 vezes maiores para *Paralabrax clathratus*, em relação aos pontos de referência. Os autores descrevem várias alterações morfológicas nos núcleos dos eritrócitos circulantes. Como as freqüências das alterações morfológicas nucleares apresentavam diferenças significativas entre os grupos coletados nas regiões poluídas e os grupos coletados em regiões não poluídas, os autores sustentaram em seu trabalho, que estas alterações eram indicadoras de efeitos genotóxicos de substância químicas presentes na água e poderiam ser incluídas nas análises realizadas em seu trabalho. Além disso, os autores fizeram considerações acerca das espécies de peixes que poderiam ser utilizadas, independentemente de suas características cariotípicas.

Em peixes, os diversos tipos de alterações nucleares ainda não apresentam sua origem completamente compreendida. CARRASCO, TYLBURY e MYERS

(1990) descreveram e fotografaram as alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes. Essas lesões foram basicamente descritas em:

- a) *Blebbbed*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). O tamanho destas evaginações varia desde pequenas protuberâncias a estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.
- b) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os blebbbed. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.
- c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.
- d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear.

Existem dois métodos de coloração diferentes mais utilizados, aplicáveis para o teste do micronúcleo: um dos métodos utiliza azul de metileno/Giemsa e o outro utiliza laranja de acridina. A coloração que utiliza azul de metileno/Giemsa tem vantagens como à distinção da coloração dos eritrócitos imaturos e dos eritrócitos maduros em ratos, bem como a preservação das lâminas. No entanto, a especificidade da coloração com azul de metileno/Giemsa para com os eritrócitos imaturos não é adequada para a observação de micronúcleos em peixes (SUGIHARA *et al.*, 2000).

A outra técnica de coloração, que utiliza laranja de acridina, é mais comumente utilizada em mamíferos, foi primeiramente modificada para peixes por UEDA *et al.* (1992) e utilizada com sucesso por HAYASHI *et al.* (1998) em células de brânquias de peixes e do sistema eritrocitário. Este método possui uma grande vantagem por se tratar de um corante altamente específico, que permite uma determinação mais exata da frequência de eritrócitos imaturos micronucleados, mas com a desvantagem de que as amostras só podem ser observadas por um curto período de tempo. Entretanto, este método é fortemente recomendado especialmente para espécimes em que o sangue periférico é utilizado, pois os micronúcleos e os eritrócitos imaturos podem ser mais facilmente identificados

devido a sua grande especificidade de coloração. Este método, porém, exige a preparação das lâminas sem fixação para a obtenção de células vivas e coradas, bem como a contagem de micronúcleos em eritrócitos imaturos no máximo um dia após a coloração devido à instabilidade da laranja de acridina (SUGIHARA *et al.*, 2000).

ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA (2005a) também utilizaram a coloração de laranja de acridina, no lugar da coloração que utiliza Giemsa, com o intuito de detectar a presença de micronúcleos em eritrócitos recém formados, melhorando assim a sensibilidade do teste. Neste caso, o princípio do teste baseia-se na presença de um conteúdo de RNA nas células, que teriam citoplasmas avermelhados e fluorescentes. O critério para a identificação de micronúcleos em eritrócitos jovens segue três princípios básicos: (a) o micronúcleo deve ser menor do que  $1/3$  do tamanho do núcleo total; (b) o micronúcleo deve estar completamente separado do núcleo principal; (c) o micronúcleo deve estar no mesmo plano de foco e ter a mesma cor do núcleo principal.

FERRARO *et al.*, (2004) utilizou o teste do micronúcleo písceo para avaliar o efeito do TBT e do chumbo inorgânico, na espécie de peixe *Hoplias malabaricus*. O teste indicou que ambas as substâncias são potencialmente mutagênicas, além disso, mostrou um grande número de alterações morfológicas nucleares, como apontadas por CARRASCO, TYLBURY e MYERS (1990). PORTO, ARAUJO e FELDBERG (2005) verificaram o efeito da poluição por mercúrio através do teste do micronúcleo písceo em diferentes espécies de peixes. Eles observaram diferenças ao compararem animais do Rio Solimões e do Rio Madeira, sendo o Rio Solimões tido como referência por estar afastado da região da mineração e sem recebimento de resíduos municipais e o Rio Madeira, próximo às áreas de mineração, apresentando animais com maior número de micronúcleos e de alterações nucleares.

LOPES-POLEZA (2004) utilizou o teste de micronúcleo písceo para avaliar o efeito do metilmercúrio na espécie de peixe *Hoplias malabaricus*, contaminadas por via trófica. O teste indicou a presença de alterações morfológicas nucleares e de micronúcleos, porém não houve diferença significativa entre os grupos controle e contaminado.



## 1.6. ENSAIO COMETA

O Ensaio Cometa, também conhecido por SCGE (Single-Cell Gel Eletrophoresis), é uma técnica capaz de detectar dano ao DNA em células individualizadas (FERRARO, 2004), através da medição da migração em gel do DNA dos nucleóides depois de uma corrida eletroforética (SINGH *et al.*, 1988). O nome cometa refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica (BOMBAIL; GORDON; BATTY, 2001).

O princípio da técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não possuir dano migrará em conjunto, formando um círculo. Caso ocorra dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os maiores. Ocorrendo um dano muito intenso, em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se então a figura típica de um cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990). As quebras detectadas pelo ensaio podem ocorrer em virtude da digestão do DNA ao processo de apoptose. Para OLIVE, BANÁTH e DURAND (1990), as células que se encontram neste processo são distinguíveis das outras, pois não apresentam um nucleóide típico, estando todo o seu DNA fragmentado.

O consenso geral atual é que este ensaio é simples, rápido e sensível, capaz de detectar uma quebra em  $1 \times 10^{10}$  Da. O ensaio também apresenta a vantagem de utilizar qualquer célula nucleada eucariótica, inclusive células vegetais (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998). Contudo, uma das maiores críticas a esta técnica é que a ocorrência de quebras no DNA não pode ser atribuída a uma exposição específica (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

São muitas as metodologias empregadas para a avaliação da extensão do dano causado ao DNA. Uma das medidas utilizadas na avaliação do dano é realizada através da relação entre o raio do núcleo e a extensão das “caudas” formadas pelo DNA em migração (classificados como classe 0 - nenhum dano, até a classe 4 - possivelmente em apoptose). Esta análise pode ser feita visualmente ou através de softwares especiais.

Nos últimos anos, tem crescido o interesse científico no Ensaio Cometa ou eletroforese em gel para demonstrar danos no DNA induzidos por contaminantes (BELPAEME *et al.*, 1998). Para tanto, são necessários métodos sensíveis adequados para se avaliar o impacto crônico desses contaminantes nos organismos. Diversas publicações provam que o ensaio cometa é realmente capaz de detectar danos no DNA causados por diferentes classes de agentes mutagênicos em peixes. A resposta pode, é claro, depender das condições experimentais, das espécies, do tipo de célula, do mutágeno e da duração da exposição (BELPAEME *et al.*, 1998).

Uma vez que, substâncias genotóxicas, muito freqüentemente, são tecido específicas, ficam evidentes as vantagens do uso do Ensaio Cometa. Este ensaio não depende da proliferação celular para ser realizado, podendo ser utilizado em, virtualmente, qualquer tipo de célula (PANDRANGI *et al.*, 1995; ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999; FERRARO, 2003). Então, o tecido alvo do agente genotóxico pode ser analisado diretamente, sendo que as células danificadas podem ser quantificadas individualmente (PANDRANGI *et al.*, 1995).

OSTLING e JOHANSON (1984) desenvolveram a técnica da eletroforese em lâmina com gel chamaram-na então de Ensaio Cometa, devido à forma peculiar tomada pelo DNA, que sofreu o processo de migração ao final da corrida eletroforética. Nesta técnica, as células eram misturadas em agarose de baixo ponto de fusão e depositadas sobre uma lâmina com agarose normal. Posteriormente, passariam por um processo de lise celular, por detergentes e soluções salinas altamente concentradas. A lise permite a liberação do DNA. As lâminas eram então submetidas à eletroforese em tampão neutro. Esta técnica apresentava algumas limitações, pois só era capaz de detectar quebras de fita dupla no DNA e ainda poderia ser confundido com o RNA ainda presente no núcleo (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

SINGH *et al.* (1988), com a intenção de verificar danos no DNA ocasionados por Raios – X e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), desenvolveram uma variação da técnica anteriormente descrita, utilizando-se de um tampão de eletroforese com pH superior a 13. Com esta modificação, foi possível a detecção no DNA das quebras em fita simples, sítios álcali-lábeis e sítios de reparo tardio.

Então, resumidamente, o ensaio consiste das etapas de preparação da suspensão celular, incubação em uma solução de lise, etapa de desespiralização do

DNA e uma corrida eletroforética. O papel da lise no ensaio cometa é o de remover os conteúdos celulares, com exceção do material nuclear. O DNA permanece bem condensado devido à presença de uma pequena quantidade de proteínas não histônicas. Porém, quando colocado na solução de eletroforese, com pH maior que 13, a espiralização do DNA começa a relaxar a partir dos pontos de quebra da fita, permitindo, dessa maneira, que os mesmos sejam revelados pela eletroforese na seqüência do teste (YENDLE *et al.*, 1997).

As condições de pH da solução de lise e do pH do tampão de eletroforese que proporcionam o relaxamento da molécula de DNA influenciam no tipo de dano a ser visualizado, bem como nas características do cometa obtido. Sob condições neutras (pH 7,5) os cometas apresentam caudas mais densas enquanto que sob condições alcalinas (pH>10) estas são mais dispersas (KLAUDE *et al.*, 1996).

Como o ensaio cometa analisa as células individualmente, estas têm que ser individualizadas, da forma que existe certa limitação no sentido de separar as células. As células devem então ser separadas por processos de fragmentação ou através da aplicação de enzimas. Estas células devem ser convenientemente separadas por meios que não as danifiquem, mas que permitam sua individualização. No caso de células sangüíneas estas podem ser diluídas em soro bovino fetal ou em solução fisiológica. Qualquer que seja o meio a ser utilizado, todo o processamento das células deve obrigatoriamente ser executado sem que danos adicionais ao DNA possam ocorrer. Desta forma, as células devem ser manipuladas ao abrigo da luz, uma vez que esta causa danos ao DNA (FERRARO, 2003).

MIYAMAE *et al.* (1998) constataram a viabilidade dos núcleos de células isoladas a partir das técnicas da homogeneização de rim, fígado, pulmão, baço e medula óssea em ratos. Esses autores, ao trabalharem com os agentes MMS (metilmetanossulfonato) e o DEN (dietilnitrosamina), verificaram que estes agem de maneira diferente em cada um dos tecidos; enquanto o MMS agiu em todos os órgãos, o DEN induziu dano genético somente no fígado, rim e pulmão. Essas diferenças podem refletir diferentes mecanismos de danos ao DNA. Enquanto o MMS reage diretamente com DNA, o DEN reage secundariamente via seus metabólitos intermediários. Outro fato importante observado nesse trabalho foi que os danos genéticos diminuíram 24 horas após o tratamento com MMS em todos os órgãos, provavelmente em decorrência do reparo e/ou morte das células danificadas, o que não foi observado no tratamento com DEN. Essas diferenças

podem, dessa forma, influenciar sobre o potencial carcinogênico de cada um destes químicos.

Trabalhos realizados com camundongos contaminados com agente conhecidamente genotóxico (etilnitrosurea) verificaram que a técnica de homogeneização foi a mais eficiente para a dissociação celular. Estes autores trabalharam com a homogeneização de vários órgãos (fígado, pulmão, baço, rim e medula óssea) em uma solução de homogeneização com 0,075 M NaCl e 0,024 M Na<sub>2</sub>EDTA e pH 7,5. As porções dos órgãos foram homogeneizadas em homogeneizador Potter®. Após a homogeneização, o homogenato obtido foi então centrifugado e os núcleos obtidos foram então levados para a realização do ensaio cometa (SASAKI *et al.*, 1997).

As quebras de fita simples, detectadas pelo método alcalino, resultam de vários tipos de reações como, por exemplo: reparo por excisão de nucleotídeos ou de bases; excisão direta de proteínas estruturais do DNA por agentes químicos ou físicos; excisão seguida de intercalação de agentes químicos na estrutura do DNA; ação de endonucleases ou topoisomerases entre outros (HORVÁTHOVÁ *et al.*, 1998; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998). Sob o aspecto do reparo da molécula de DNA, os organismos aquáticos, e no caso específico dos peixes, os mecanismos de reparo do DNA são mais lentos do que nas células de mamíferos (ESPINA; WEISS, 1995).

É importante ressaltar que a técnica do ensaio cometa foi originalmente desenvolvida para detectar efeitos genotóxicos em mamíferos, mostrou-se, porém de grande eficiência na detecção de substâncias genotóxicas em organismos de ambiente aquático, além de encontrar amplo emprego na área clínica em estudos de reparo do DNA no biomonitoramento ambiental e no monitoramento humano (FERRARO, 2003).

O ensaio cometa é habitualmente realizado com eritrócitos, pois estes são facilmente obtidos por métodos não destrutivos e não necessitam do passo adicional de isolamento, porém outros tecidos também têm sido testados, pois os efeitos de genotoxicidade de contaminantes podem ser muitas vezes, tecido-específicos (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998). O sangue também apresenta a vantagem de apresentar em sua composição aproximadamente 97% de eritrócitos nucleados e apenas cerca de 3% de leucócitos, o que confere alta homogeneidade ao tecido (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

Os tecidos mais pesquisados, além do sanguíneo, são do fígado, por se tratar do principal órgão do metabolismo, das brânquias, devido ao seu contínuo contato com a fase aquosa e do rim, tecido produtor de sangue em peixes (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

Alguns trabalhos realizados em *Hoplias malabaricus* podem ser úteis na elucidação de mecanismos envolvidos na detoxificação dos xenobiontes nesta espécie. Quando submetido à contaminação aguda por diferentes concentrações de chumbo inorgânico (RAMSDORF *et al.*, *in press*), a espécie apresentou resultados significativos para o ensaio cometa em eritrócitos. RAMSDORF *et al.* (*in press*) também realizou o ensaio cometa para o tecido renal, não obtendo com este um resultado significativo. Neste caso, o sangue apresentou uma maior sensibilidade ao teste, possivelmente devido ao tipo de contaminação realizado. FERRARO *et al.* (2004) também submeteu a espécie *Hoplias malabaricus* à contaminação trófica, por diferentes contaminantes: tributilestanho (TBT) e chumbo inorgânico (Pb II). Após 60 dias de contaminação, o grupo contaminado por TBT não mostrou diferenças significativas para o ensaio cometa em eritrócitos. Já para o Pb II, o ensaio cometa em eritrócitos mostrou diferenças significativas com relação aos animais do controle.

Segundo BELPAEME; COOREMAN e KIRSCH-VOLDERS (1998), apesar das inúmeras vantagens do ensaio, algumas desvantagens importantes permanecem, como a inability de detectar dano genético assim como mutação gênica; lesões produzidas no DNA não são estáveis e podem ser reparadas, assim como a estimativa em longo prazo dos efeitos em organismos é difícil; elevadas variabilidades inter e intra-individuais podem impedir a clara interpretação dos resultados e a quantificação do número de quebras não é possível.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Diante da ampla distribuição e relativa abundância do gênero *Hoplias* este trabalho utilizou esta espécie para verificar se existe diferença significativa de respostas ao xenobionte metilmercúrio para duas concentrações (0,075 µg/g e 0,75 µg/g), ao qual a espécie estará exposta durante o bioensaio subcrônico trófico, com relação aos indivíduos controle e às concentrações. Este trabalho tem como objetivo geral, a avaliação do efeito genotóxico do mercúrio orgânico, na forma de metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ), no bioindicador *Hoplias malabaricus* (Pisces). Além disso, frente à escassez de dados de genotoxicidade de espécies nativas, esse trabalho se fez necessário na tentativa de gerar um banco de dados mais consistente sobre as respostas da ação do metilmercúrio em traíras.

### 2.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar e comparar as frequências de micronúcleos, bem como de alterações morfológicas nucleares, em hemácias periféricas, dos peixes submetidos à contaminação e os controles.
- b) Avaliar e comparar as frequências micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos normocromáticos e policromáticos, nos peixes submetidos à contaminação e nos controles.
- c) Avaliar e comparar os danos no DNA através do Ensaio Cometa de hemácias periféricas em peixes submetidos à contaminação e os controles.
- d) Avaliar e comparar os danos no DNA através do Ensaio Cometa de células renais (porção anterior do rim) em peixes submetidos à contaminação e os controles.
- e) Comparar as respostas para as diferentes concentrações do xenobionte.

### 3. ARTIGO

Ação do metilmercúrio sobre o DNA da traíra (Teleostei: *Hoplias malabaricus*),  
após contaminação trófica.

Publicação relacionada:

VICARI, T.; FERRARO, M.V.M.; RAMSDORF, W.A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; MELLA, M.; CESTARI, M.M. Manuscrito a ser enviado à publicação para a revista Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O ambiente aquático é o destino final dos poluentes produzidos por fontes naturais e/ou antropogênicas e o acúmulo e persistência dessas substâncias neste ambiente constitui uma ameaça para a vida (FLEEGER, CARMAN, NISBET, 2003).

O mercúrio é considerado um dos compostos mais perigosos ao ambiente aquático, devido a sua alta toxicidade, propriedades bioacumulativas, e outros efeitos deletérios na biota, incluindo efeitos genéticos e mutagênicos (WHO, 1990). O mercúrio é um contaminante onipresente nos ambientes e é espalhado globalmente através de emissões geológicas naturais, bem como através de atividades antropogênicas, como a queima de combustíveis fósseis, mineração, operações de fundição e indústrias de cloro-álcalis (WREN *et al.*, 1995).

As formas inorgânicas do mercúrio são as formas mais comuns nos ecossistemas aquáticos, que podem ser convertidas em formas orgânicas, como por exemplo, o metilmercúrio, por processos biogeoquímicos (GUILHERME *et al.*, 2008). Todas as formas de mercúrio são extremamente tóxicas, mas o metilmercúrio é uma grande preocupação, em especial como um contaminante aquático, devido à sua lipofilicidade e conseqüente disponibilidade para os microorganismos, aumentando o risco para as teias alimentares aquáticas (GUILHERME *et al.*, 2008).

A atual sensibilização dos perigos potenciais dos metais pesados no ambiente aquático tem estimulado muito interesse no uso de peixes como indicadores em biomonitoramento ambiental de substâncias cancerígenas, mutagênicas e teratogênicas (VAN DER OOST *et al.*, 2003). A molécula de DNA é o alvo da maioria, senão de todos, os agentes mutagênicos e cancerígenos. Uma vez que há uma crescente preocupação com a presença de compostos genotóxicos e mutagênicos no ambiente, se fez necessário o desenvolvimento de métodos para a detecção desses efeitos nos organismos aquáticos, chamados de biomarcadores.

O teste do micronúcleo (MN) é considerado um dos métodos mais úteis para a avaliação da genotoxicidade nos ecossistemas aquáticos. Os micronúcleos são formados por fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que atrasaram durante a divisão celular devido a falta de centrômero, dano, ou um defeito na citocinese. Assim a avaliação dos MN fornece uma medida de potenciais aneugênicos e clastogênicos dos agentes ambientais (HEDDLE *et al.*, 1991). Os eritrócitos são as células mais utilizadas no teste de micronúcleo pístico, entretanto,



hepatócitos (ÇAVAS, GARANKO, ARKHIPCHUK, 2005), células do epitélio branquial (ÇAVAS, GARANKO, ARKHIPCHUK 2005), e células das nadadeiras (ARKHIPCHUK; GARANKO, 2005) também tem sido utilizadas (ÇAVAS, 2008). Embora os mecanismos responsáveis pelas alterações morfológicas nucleares ainda não sejam completamente compreendidos, estas anormalidades são consideradas como sendo indicadoras de genotoxicidade e, portanto, podem complementar a pontuação de micronúcleos nos ensaios de genotoxicidade (ÇAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2005b).

O ensaio cometa (ou eletroforese em gel de uma única célula - SCGE) é um método mais recente e ainda não tem sido muito utilizado em pesquisas de campo até recentemente (KLOBUCAR *et al.*, 2003). O ensaio cometa detecta quebras na fita do DNA e sítios álcali-lábeis através da medição da migração do DNA a partir de DNA nuclear imobilizado (SINGH *et al.*, 1988). O nome refere-se à formação de uma longa cauda como a de um cometa, de fragmentos de DNA, na sequência da quebra da fita de DNA. (BOMBAIL, GORDON, BATTY, 2001). As vantagens do ensaio cometa para avaliar danos ao DNA em animais aquáticos incluem: (1) o dano ao DNA em células individuais pode ser medido; (2) apenas um número pequeno de células é necessário para efetuar o ensaio (<10,000); (3) o ensaio pode ser executado em praticamente qualquer tipo de células eucariotas; (4) é um método muito sensível para detecção dos danos aos DNA (LEE; STEINERT, 2003).

O objetivo deste estudo foi avaliar o dano genotóxico na espécie de peixe *Hoplias malabaricus* exposta a duas concentrações de metilmercúrio (0,075 e 0,75µg/g), por via trófica. Para tanto, foram utilizados o teste do micronúcleo pisco (englobando alterações nucleares) em eritrócitos e o ensaio cometa em eritrócitos e em células do tecido renal.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

*Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) foi escolhida por ser uma espécie de peixe neotropical piscívora com uma ampla distribuição geográfica (do Panamá até o rio Colorado - sul da Argentina). Este peixe tem a vantagem de ser facilmente alimentado em condições laboratoriais e em bioensaios, porque ele devora a sua presa inteira. Isto facilita a contaminação com qualquer xenobionte de interesse, por via trófica (FERRARO *et al.*, 2004). Quarenta e dois espécimes de *H. malabaricus* foram aclimatados por 40 dias, com uma densidade populacional de 1 peixe em cada aquário de 30 litros contendo água de-clorada em pH 8, mantidos a 23°C, sob aeração constantes e foto período de 12-h.

Após o período de aclimação, as traíras foram alimentadas com peixes do gênero *Astyanax* (lambaris) previamente contaminados com injeção intraperitoneal de metilmercúrio (0,075 e 0,75µg de CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> /g de peso corporal das traíras). As traíras do grupo controle foram alimentadas com lambaris que receberam água destilada. Dos 42 peixes que fizeram parte do experimento, 12 foram utilizados como organismos controle, 15 foram contaminados com a concentração de 0,075µg de CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>/g e 15 com 0,75µg de CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>/g de peso corporal das traíras. Todas as traíras foram alimentadas com os lambaris a cada 5 dias. No total foram 65 dias de contaminação, contendo 13 ciclos de alimentação, um a cada 96 horas. Cinco dias após o último ciclo de alimentação, as traíras foram anestesiadas com benzocaína 20% (Merck, Darmstadt, Germany) (GOMES *et al.*, 2001) preparadas para a retirada das amostras.

Para o teste do micronúcleo písceo e para o Ensaio Cometa em eritrócitos, as amostras de sangue foram obtidas a partir da veia caudal, utilizando-se seringas heparinizadas. Posteriormente a porção anterior do rim foi removida para o ensaio cometa em tecido renal.

#### Teste do Micronúcleo

Uma gota de cada amostra de sangue foi utilizada para a confecção das lâminas através de esfregaço. Então, as lâminas de esfregaço foram deixadas secando ao ar, na temperatura ambiente e posteriormente fixada em etanol P.A., por 30 minutos. Posteriormente as lâminas foram secas a temperatura ambiente e

coradas com Giemsa 10% em pH 6.8, em tampão fosfato por 15 minutos. Para cada peixe, um total de 2000 eritrócitos foi examinado, sob um microscópio óptico, com ampliação de 1000X, em teste cego. A genotoxicidade foi testada utilizando-se o teste do micronúcleo písceo, realizado em eritrócitos periféricos maduros, de acordo com os procedimentos de SCHMID (1975), e os resultados foram expressos através da soma de todas as alterações encontradas. Apenas eritrócitos nucleados e com membranas celulares e nucleares intactas foram pontuados. Partículas arredondadas, com um diâmetro de 1 / 5 a 1 / 20 do núcleo principal, sem nenhuma ligação com o mesmo, e com uma coloração característica coerente com o núcleo principal e uma imagem não-refratária, foram aceitos como micronúcleos.

#### Coloração fluorescente

A coloração com laranja de acridina para os eritrócitos foi realizada de acordo com (UEDA et al., 1992). O sangue periférico foi coletado da veia caudal e diluído com a mesma quantidade de soro bovino fetal (Gibco) sendo posteriormente feito esfregaço em lâminas limpas. As lâminas foram deixadas para secar *overnight* e fixadas com metanol por 10 minutos. Imediatamente antes de serem analisadas em microscópio, as células foram coradas com 0.003% de uma solução de laranja de acridina diluída em tampão Sorenson em pH 6.8, por 2–3 minutos e montadas com o mesmo tampão.

#### Frequência de eritrócitos imaturos (EI)

Foram analisados 2000 eritrócitos tanto para o MN quanto para aqueles corados com laranja de acridina (maduros (EM) + imaturos (EI)). Estes últimos foram analisados em microscopia de fluorescência sob uma ampliação de 100X. Os resultados foram apresentados em frequência relativa, resultante da expressão (GUILHERME *et al.*, 2008):

$$\text{Frequência de E.I.} = \frac{\text{E.I.}}{(\text{EM} + \text{EI})} \times 100,$$

onde EM: eritrócitos maduros; EI: eritrócitos imaturos.

A distinção entre eritrócitos imaturos e maduros foi baseada no critério estabelecido por ÇAVAS e ERGENE-GOZUKARA (2005a). Sucintamente, os

eritrócitos imaturos (policromáticos) possuem o núcleo principal corado em verde-amarelo, e o citoplasma possui uma coloração vermelho característica, devido à afinidade do corante pelo grande conteúdo de RNA destas células. Já os eritrócitos maduros (normocromáticos) possuem apenas o núcleo principal corado em verde-amarelo.

### Ensaio Cometa

O procedimento utilizado foi basicamente o mesmo descrito por SINGH *et al.* (1988), com modificações feitas por FERRARO *et al.* (2004). Lâminas para microscopia limpas foram preparadas cobrindo-as com uma fina camada de 0,75% agarose com ponto de fusão normal (NMP - Gibco) e deixadas para secar overnight. Para cada lâmina coberta com agarose, 10µl da solução de sangue + soro bovino fetal preservada por 24 horas à 4°C na ausência de luz (RAMSDORF *et al.*, 2009) foi misturada à 120µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMP - Gibco) e colocada sobre a lâmina. Todo o processo segue segundo FERRARO *et al.* (2004).

O procedimento utilizado para o ensaio cometa em células renais seguiu RAMSDORF *et al.* (*in press*). As células de tecido renal, utilizadas para o ensaio cometa, foram homogeneizadas (homogenizador tipo Potter, em 1500 rpm) em solução tampão Sacarose-Tris-HCl (pH 8,6). A partir da solução final, 50µL foram misturados com 120µL de LMP (0,5%), e dessa mistura de células renais com agarose, 120µL foram colocados sobre as lâminas e cobertas com lamínulas. Em seguida, as lâminas foram colocadas na geladeira por 10 minutos para permitir a completa polimerização da agarose.

Depois da polimerização da agarose, as lamínulas foram gentilmente removidas e as lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise recém preparada a 4°C, por 24 horas, para remover as proteínas celulares. Após a lise, as lâminas foram retiradas desta solução e colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal. O tampão, recentemente preparado, foi adicionado à bandeja da cuba e as lâminas foram submersas em tampão alcalino (pH > 13), durante 30 minutos a 4 °C, permitindo o desenovelamento das moléculas de DNA das células. Para a eletroforese, o suprimento de energia foi fixado em 25 V, e a corrente ajustada para 300 mA. As lâminas foram expostas a essa corrente, no escuro, a 4 °C por 25 minutos. Depois, as lâminas foram removidas da cuba e imersas em um tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5), três sessões, no escuro, com duração de 5

minutos cada sessão. Após a última neutralização, o tampão foi retirado e as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 5 minutos. Para as análises, as lâminas foram coradas com 20µl de brometo de etídio (10mg/ml), e cobertas com lamínulas. As lâminas foram examinadas em aumento de 400x, usando um microscópio Leica de epifluorescência.

Para cada exemplar, 100 células (nucleóides) foram analisadas visualmente (COLLINS *et al.*, 1997) baseadas na migração dos fragmentos de DNA do núcleo da classe 0 (sem danos visíveis), classe 1 (pouco dano), classe 2 (dano médio), classe 3 (grande número de danos) e 4 (dano máximo). O score foi calculado multiplicando o número de nucleóides encontrados em cada uma das classes e o número da classe.

#### Análise Estatística

O software Bio Stat foi utilizado para a realização das análises estatísticas. A ANOVA foi utilizada para comparar os resultados entre os grupos de peixes, somente para os eritrócitos imaturos (EI). Diferenças entre peixes tratados com as duas doses de metilmercúrio e o grupo controle foram testadas utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal- Wallis tanto para o teste de micronúcleo písceo utilizando Giemsa, quanto para os ensaios cometa de células renais e de células eritrocitárias.

### 3.3 RESULTADOS

Os resultados gerais da análise de micronúcleos, alterações morfológicas nucleares e das células normais coradas com Giemsa (TABELA 1 e FIGURA 4) mostraram que não houve diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratado com 0,075µg/g de metilmercúrio ( $p= 0,2684$ ) e entre o grupo controle e o grupo tratado com 0,75µg/g ( $p= 0,2684$ ) (FIGURA 5).

**TABELA 1 – RESULTADOS GERAIS ENCONTRADOS PARA OS ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS E OS ERITRÓCITOS COM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES.**

Número de eritrócitos						
Dosagens	Micronúcleos (MN)			Alterações morfológicas nucleares (AMN)		Mediana (MN+AMN)
	N	Total (%)	Mediana (q1/q3)	Total (%)	Mediana (q1/q3)	Mediana (q1/q3)
Controle	13	0.02%	0 (0/1)	1.96%	42 (24/64)	43 (23/63)
0,075µg/g	15	0.01%	0 (0/0.5)	1.66%	36 (17.5/46)	36 (17.5/46)
0,75µg/g	15	0.0066%	0 (0/0)	1.37%	24 (15.5/34.5)	24 (15.5/34.5)

FIGURA 4 – EXEMPLOS DE ERITRÓCITOS COM ALTERAÇÕES NUCLEARES ENCONTRADOS NOS EXEMPLARES (A, B, C, D, E, F, G, H, I), BEM COMO A PRESENÇA DE ERITRÓCITOS COM NÚCLEOS NORMAIS (J).

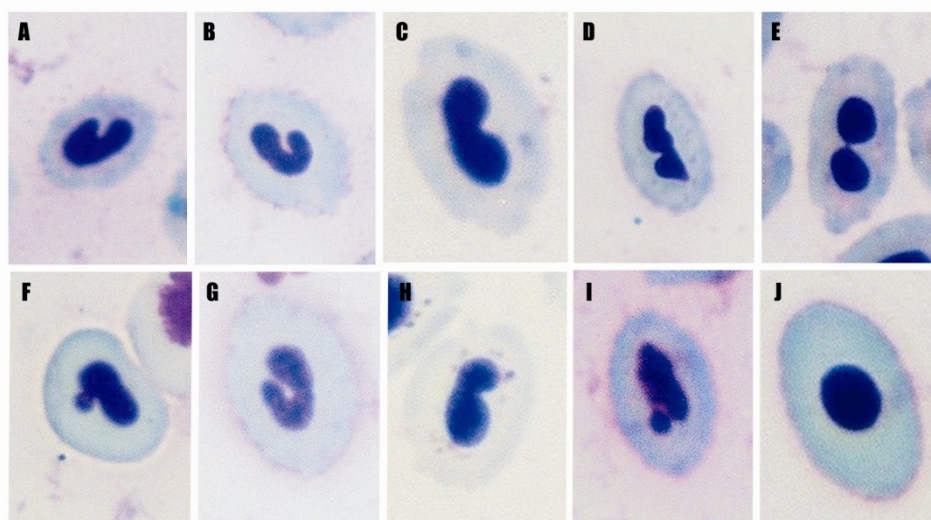
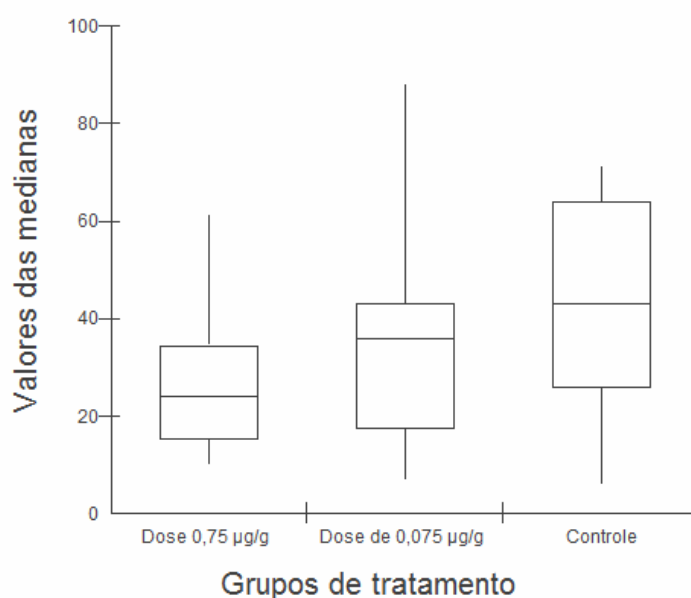


FIGURA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE TRATAMENTO, REALIZADA ATRAVÉS DAS MEDIANAS DO NÚMERO DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES ENCONTRADAS.



Nas lâminas coradas com laranja de acridina, também foram analisadas a presença e a ausência de estruturas classificadas como micronúcleos (MN), bem

como de outras alterações morfológicas nucleares (AMN) visualizadas tanto em eritrócitos maduros (EM - normocromáticos) (FIGURA 6) como nos eritrócitos imaturos (EI - policromáticos) (FIGURA 7). Estas análises têm como principal característica permitir uma análise mais detalhada das células e uma melhor explicação para a dinâmica hematológica da espécie em exposição.

Na TABELA 2 são apresentados os resultados gerais da análise de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares dos EM e dos EI e na TABELA 3 são apresentadas as médias das freqüências de EI encontradas em cada grupo de tratamento.

Neste caso, como a análise estatística empregada foi uma análise de variância (ANOVA), temos a média com uma possibilidade de análise. A ANOVA mostrou que não há uma variação significativa entre o número de eritrócitos maduros e imaturos, entre o grupo controle e os grupos contaminados. Neste caso, podemos observar claramente que, apesar dos resultados não apresentarem uma diferença significativa, há uma diminuição real da freqüência de eritrócitos imaturos (policromáticos) nos grupos contaminados em relação ao grupo controle (FIGURA 8). Além disso, pode-se observar ainda que, quando utilizada a maior concentração do xenobionte, a média da freqüência dos eritrócitos imaturos foi ainda menor.

FIGURA 6 – EXEMPLOS DE ERITRÓCITOS NORMOCROMÁTICOS (MADUROS) COM ALTERAÇÕES NUCLEARES ENCONTRADOS NOS EXEMPLARES (A, B, C, D, E, F, G, H, I), BEM COMO A PRESENÇA DE ERITRÓCITOS COM NÚCLEOS NORMAIS (J).

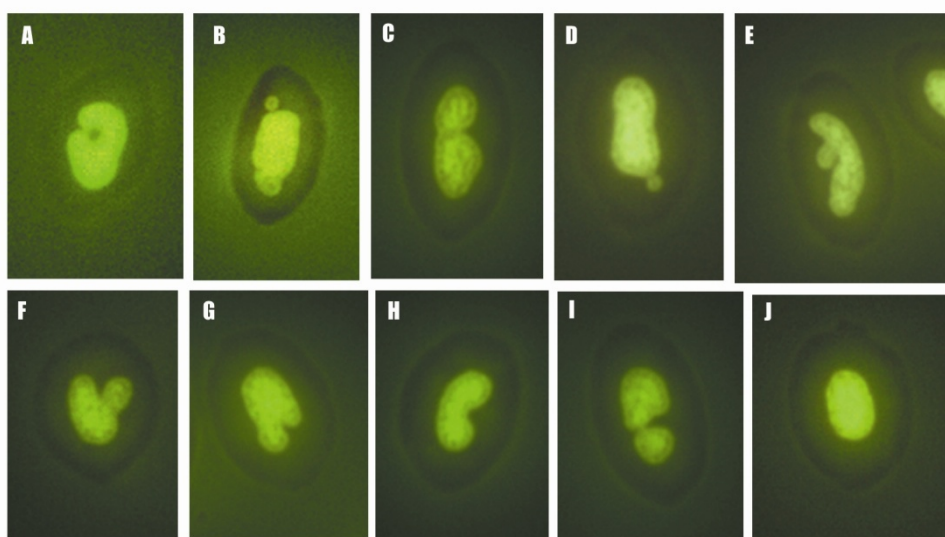




FIGURA 7 – EXEMPLOS DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS (IMATUROS), COM ALTERAÇÕES NUCLEARES ENCONTRADOS NOS EXEMPLARES (A, B, C, D, E, F, G, H, I), BEM COMO A PRESENÇA DE ERITRÓCITOS COM NÚCLEOS NORMAIS (J).

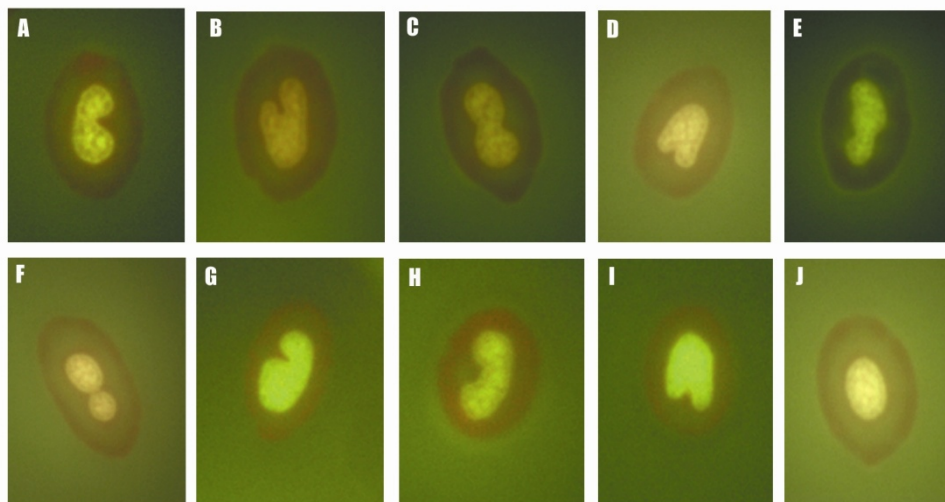


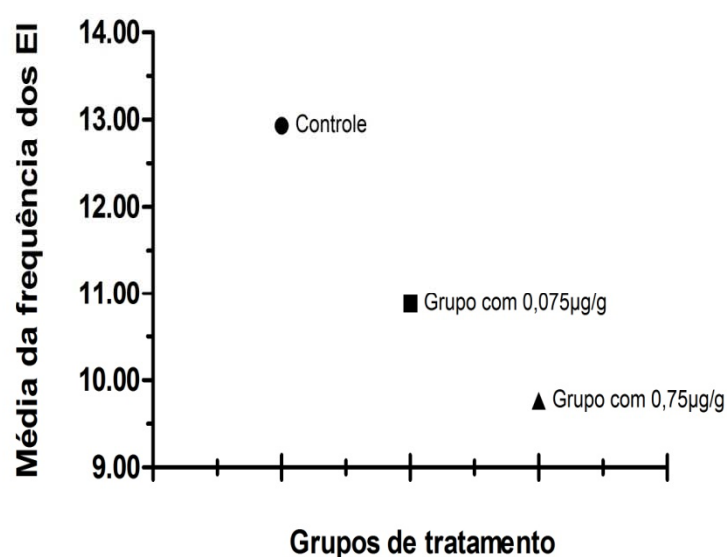
TABELA 2 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO ENCONTRADOS PARA OS ERITRÓCITOS MADUROS (NORMOCROMÁTICOS) E IMATUROS (POLICROMÁTICOS) ENTRE AS CÉLULAS NORMAIS E ALTERADAS.

Número de eritrócitos					
Policromáticos (IMATUROS)				Normocromáticos (MADUROS)	
Dosagens	N	Normais (Média ±SD)	Alterados (Média ±SD)	Normais (Média ±SD)	Alterados (Média ±SD)
Controle	13	253±94.69	5.61±4.31	1701.23±106.07	38.61±16.01
0,075µg/g	15	210.53±124.40	7.06±5.99	1731.66±135.02	53.33±23.58
0,75µg/g	15	191.13±135.44	4.13±3.79	1703.8±280.52	37.4±24.32

TABELA 3 – MÉDIA DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS IMATUROS (E.I.) (POLICROMÁTICOS) EM RELAÇÃO AO TOTAL ENCONTRADO (NORMOCROMÁTICOS + POLICROMÁTICOS).

Grupos	N	Média das frequências dos E.I.
Controle	13	12,93
Dose de 0,075µg/g	15	10,88
Dose de 0,75µg/g	15	9,766

FIGURA 8 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS FREQUÊNCIAS DOS ERITRÓCITOS IMATUROS DE CADA GRUPO DE TRATAMENTO.



No Ensaio Cometa em eritrócitos, foram analisadas 100 células (nucleóides) de cada indivíduo utilizado no experimento, perfazendo um total de 1500 células analisadas no primeiro tratamento ( $0,75\mu\text{g/g}$ ), 1500 células analisadas no segundo tratamento ( $0,075\mu\text{g/g}$ ) e 1300 células analisadas no grupo controle. Desse modo, 4300 nucleóides foram analisados (FIGURA 9) e computados nas TABELAS 4 e 5.

FIGURA 9 – CAPTURA DE IMAGEM DE UMA LÂMINA DE ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS, EVIDENCIANDO ALGUNS TIPOS DE DANO CELULAR.

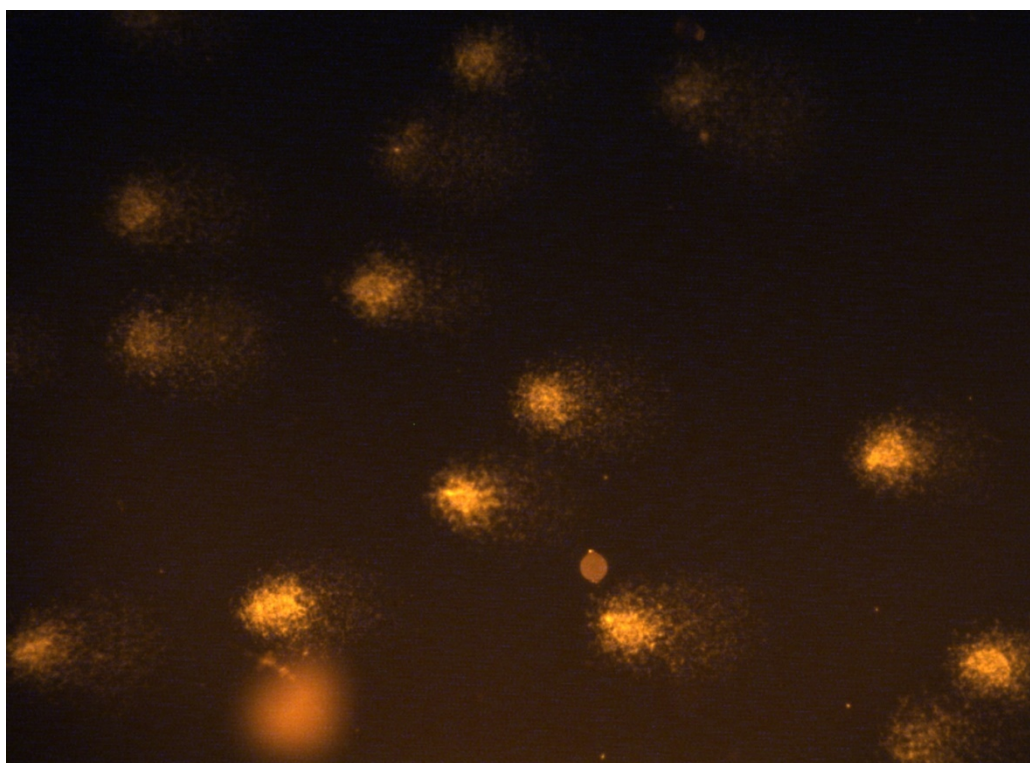


TABELA 4 – MEDIANAS DO NÚMERO DE CÉLULAS ANALISADAS NO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS PARA OS RESPECTIVOS TIPOS DE DANO ENCONTRADOS.

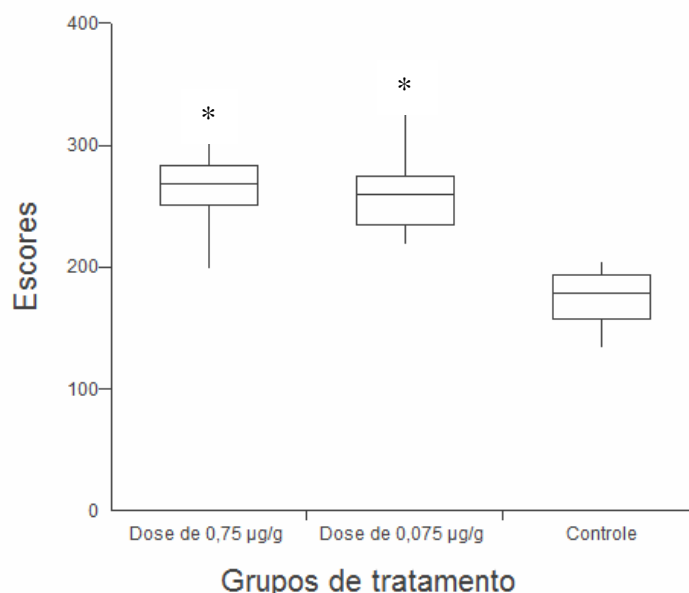
Grupos	N	0 Mediana (q1/q3)	1 Mediana (q1/q3)	2 Mediana (q1/q3)	3 Mediana (q1/q3)	4 Mediana (q1/q3)
Controle	13	17.5 (13.25/21.25)	31 (26.25/41.25)	17 (11.25/28.75)	12.5 (10/18)	11 (9.25/15.5)
0,075µg/g	15	3.5 (2/6.25)	7.5 (2.75/12.5)	32 (16.75/38.25)	34 (20.75/40.25)	17 (13.5/26.25)
0,75µg/g	15	4 (2/5)	9 (6/13)	20.5 (12/28)	40 (28,75/50)	20 (14.5/29)

TABELA 5 – MEDIANA DOS ESCORES NO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS, JUNTAMENTE COM OS QUARTIS.

Grupos de tratamento	Escore Mediana (q1/q3)
Controle	179 (157/193)
0,075µg/g	259 (235/274)
0,75µg/g	268 (251.5/283)

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi empregado para a análise dos resultados observados. O teste estatístico mostrou que há diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratado com 0, 075µg/g de metilmercúrio ( $p=0$ ) e entre o grupo controle e o grupo tratado com 0,75µg/g de metilmercúrio ( $p=0$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com metilmercúrio ( $p=0,6365$ ) (FIGURA 10).

FIGURA 10 – COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE TRATAMENTO REALIZADA ATRAVÉS DAS MEDIANAS DOS ESCORES DO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS ENCONTRADOS.  
( \*.p<0,05)



No Ensaio Cometa realizado com células do tecido renal, foram analisadas 100 células (nucleóides) de cada indivíduo utilizado no experimento, perfazendo um total de 1500 células no primeiro tratamento (0,75 µg/g), 1300 no segundo tratamento (0,075 µg/g) e 1300 no grupo controle, totalizando 4100 nucleóides. Estes foram analisados e classificados individualmente em cinco classes de cometa de acordo com o tipo de dano encontrado (de dano 0 ao dano 4) (COLLINS et al., 1997) (FIGURA 11).

Na TABELA 6 estão apresentadas as observações feitas nestes nucleóides analisados e suas respectivas classificações quanto ao tipo de dano identificado e os escores calculados estão na TABELA 7.

TABELA 6 – MEDIANA DO NÚMERO DE CÉLULAS ANALISADAS NO ENSAIO COMETA DE CÉLULAS RENAI, COM OS RESPECTIVOS TIPOS DE DANO ENCONTRADOS.

Grupos	N	0 Mediana (q1/q3)	1 Mediana (q1/q3)	2 Mediana (q1/q3)	3 Mediana (q1/q3)	4 Mediana (q1/q3)
Controle	13	19 (16.75/22.75)	24.5 (17.5/31.5)	12 (7.5/18)	18 (7.75/22.25)	10 (6.75/15.75)
0,075µg/g	15	14.5 (8.75/20.5)	29 (16/35.25)	13.5 (9.25/17.75)	20 (14/27)	17 (10.25/21.5)
0,75µg/g	15	9.5 (3.5/25.25)	17.5 (10/23.25)	17.5 (11.75/24.25)	20.5 (15.25/32)	12 (6.75/21.25)

TABELA 7 – MEDIANA DOS ESCORES DO ENSAIO COMETA EM CÉLULAS DO TECIDO RENAL, JUNTAMENTE COM OS QUARTIS.

Grupos experimentais	Escore Mediana (q1/q3)
Controle	169 (122.5/171.5)
0,075µg/g	175 (167/209)
0,75µg/g	189 (158.5/236)

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis mostrou que não há diferenças significativas, para o ensaio cometa de tecido renal, entre o grupo controle e o grupo tratado com 0, 075µg/g de metilmercúrio entre o grupo controle e o grupo tratado com 0,75µg/g de metilmercúrio ( $p= 0,2677$ ) e nem entre os grupos tratados (FIGURA 12).

FIGURA 11 – CAPTURA DE IMAGEM DE UMA LÂMINA DE ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAIIS, EVIDENCIANDO ALGUNS TIPOS DE DANO CELULAR.

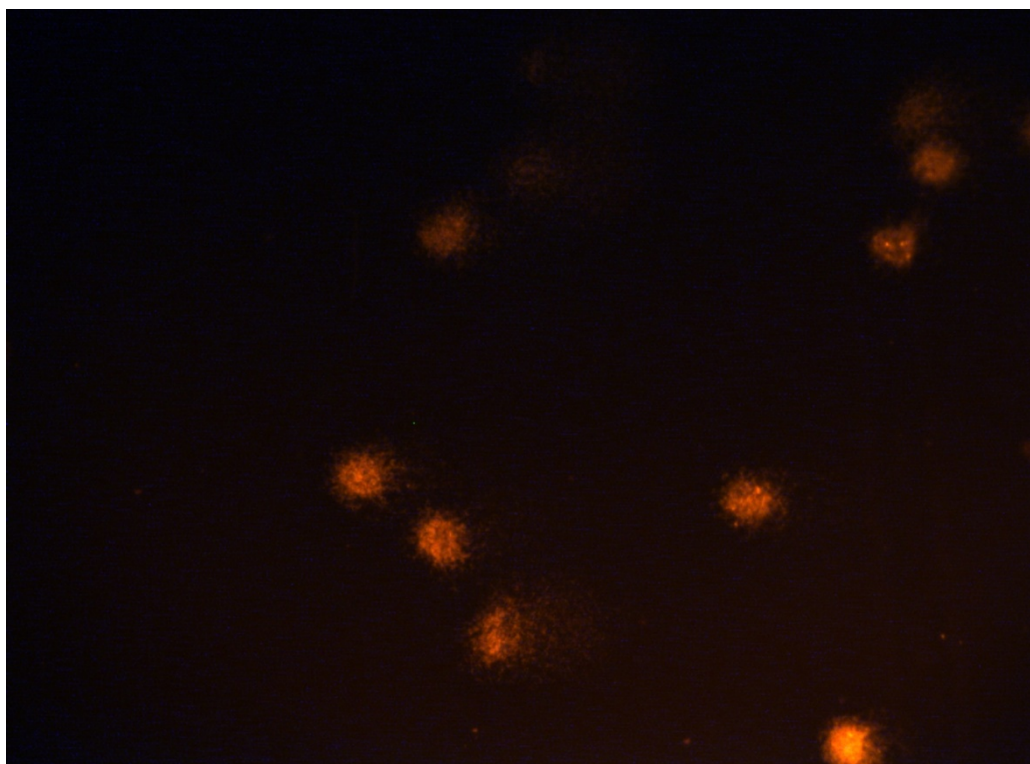
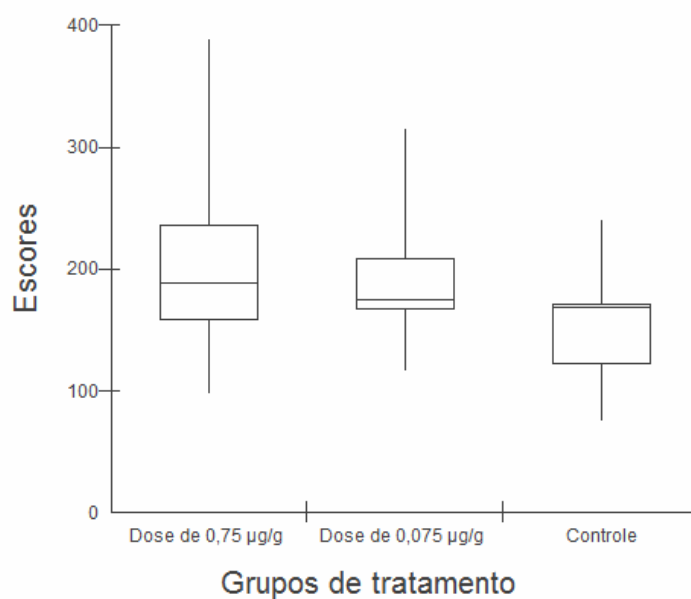


FIGURA 12 – COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE TRATAMENTO REALIZADA ATRAVÉS DAS MEDIANAS DOS ESCORES DO ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAIIS ENCONTRADOS.



### 3.4 DISCUSSÃO

A avaliação de testes toxicológicos de curto prazo, principalmente os de cunho genético, são ferramentas muito úteis para determinar a toxicidade de certos compostos, bem como o efeito no material genético das células, gerando informações que possibilitem a identificação do potencial carcinogênico e conseqüente proteção da saúde pública e do meio ambiente.

Os organismos aquáticos, em todos os níveis, acumulam mercúrio em seus tecidos. Este mercúrio é retido por longos períodos, se estiver em uma forma orgânica (metilada). Há uma série de fatores que afetam a susceptibilidade dos organismos aquáticos ao mercúrio. Estes incluem algumas fases do ciclo de vida (a fase larval é particularmente sensível), o desenvolvimento da tolerância, a temperatura e a dureza da água (CASTRO-GONZÁLEZ e MÉNDEZ-ARMENTA, 2008).

No presente estudo investigou-se o potencial genotóxico e citotóxico do metilmercúrio, usando a espécie *Hoplias malabaricus*, popularmente conhecida como traíra (Bloch) (Characiformes, Erythrinidae) como organismo modelo. Traíra é um peixe carnívoro de água doce, que possui uma ampla distribuição na América do Sul. A espécie *H. malabaricus* possui uma grande tolerância a privação alimentar, sobrevivendo por períodos de até 180 dias, sem redução da taxa metabólica (consumo de oxigênio; RIOS *et al.* 2005). Esta espécie foi escolhida como modelo biológico para este estudo, pois devido à voracidade com que ataca suas presas, facilita a exposição trófica a qual foi submetida, além de se adaptar bem as condições experimentais e ocupar uma alta posição na cadeia alimentar, estando sujeita a processos de biomagnificação (PORTO, ARAUJO, FELDBERG, 2005). PORTO, ARAUJO e FELDBERG (2005) ao avaliarem o efeito genotóxico causado pela poluição por mercúrio através de um biomonitoramento de espécies de peixe da região Amazônica, aplicando o teste do micronúcleo píficeo, evidenciaram um aumento da média da frequência de micronúcleos na espécie piscívora *Hoplias malabaricus*, em relação à espécie detritívora *Prochilodus nigricans* e à espécie onívora *Mylossoma duriventris*.

De acordo com DE FLORA *et al.* (1994), a genotoxicidade de compostos de mercúrio, tanto os orgânicos como os inorgânicos são qualitativamente comparáveis, sugerindo o envolvimento de uma entidade genotóxica comum e, portanto, dependendo principalmente de uma biodisponibilidade diferencial. As formas orgânicas do mercúrio são mais susceptíveis de serem responsáveis pela observada



ação aneugênica e clastogênica, devido a sua lipofilicidade. O metilmercúrio no peixe é originado através de bactérias, que realizam a metilação do mercúrio inorgânico, quer no ambiente ou as próprias associadas com as brânquias ou intestino (BOENING, 2000).

Como demonstrado anteriormente por DAS e NANDA (1986) e BRUNETTI *et al.* (1988), a indução de lesões nucleares por agentes genotóxicos pode ser mascarado através de uma ação citotóxica, que mata os eritrócitos em vez de formar lesões celulares não letais, um dos motivos pelos quais possivelmente não pudemos evidenciar neste trabalho diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos contaminados quando foi utilizado o teste do micronúcleo písceo. Além disso, o aparecimento de lesões nucleares é afetado por uma variedade de fatores, tais como a eritropoiese e o tempo necessário para a maturação e a longevidade dos eritrócitos (UDROIU, 2006).

Uma diminuição gradual na frequência de MN com um aumento do período de exposição, bem como a maior concentração dos agentes genotóxicos foi encontrada por DAS e NANDA (1986), e explicado por um efeito inibitório sobre a divisão celular e subsequente impedimento na passagem das células afetadas para a circulação periférica (NEPOMUCENO *et al.*, 1997). Este efeito pode ser resultado tanto da inibição da síntese do DNA (WILLIAMS; METCALFE, 1992) quanto da inibição direta da eritropoiese (DINNEN *et al.*, 1988) causada por vários agentes genotóxicos, em certas concentrações, e considerado como uma propriedade citotóxica dos xenobióticos (UDROIU, 2006). Todos estes fatores devem ser cuidadosamente considerados, pois eles podem ser a base para um resultado falso negativo.

Analisando a literatura, a falta de critérios uniformes para a mensuração das anormalidades nucleares é evidente, tornando difícil a comparação dos resultados de diferentes laboratórios. Apesar de algumas divergências, parece ser consensual que os problemas de segregação aliados a união cromossômica ou amplificação gênica por meio de ciclos de quebra-fusão-ponte poderiam causar núcleos “notched” (NB), que incluiriam os núcleos lobed e blebbed, durante a eliminação de DNA amplificado a partir do núcleo (TOLBERT *et al.*, 1992; SHIMIZU *et al.*, 1998, 2000). De acordo com SERRANO-GARCIA e MONTERO-MONTOYA (2001), os fenômenos de brotação dos núcleos celulares e de células bi-nucleadas têm uma origem semelhante com os MN e se supõem ser decorrentes de agentes genotóxicos. Além disso, uma relação positiva e significativa entre MN e indução de NB foi encontrada

por vários autores (FERRARO *et al.*, 2004; BOLOGNESI *et al.*, 2006; ERGENE *et al.*, 2007; RAMSDORF *et al.*, *in press*), sugerindo que a formação de NB nos eritrócitos pode ser útil para uma análise complementar da avaliação da genotoxicidade em peixes. Além disso, segundo HAYASHI *et al.* (1998), o teste do micronúcleo realizado com células de brânquias mostrou-se mais sensível que os eritrócitos, concordando com ÇAVAS, GARANKO e ARKHIPCHUK (2005) que também relatam sensibilidade maior de células de brânquias e de fígado frente às do sistema eritrocitário.

No presente trabalho, a ausência de micronúcleos não necessariamente significou a ausência de efeitos genotóxicos da substância. Muito provavelmente esta ausência está relacionada com a falta de algumas informações devido ao forte efeito citotóxico do metilmercúrio. Além disso, existem fortes evidências de que o grande número de alterações morfológicas nucleares encontradas deve ser considerado como manifestações dos efeitos genotóxicos do contaminante em peixes. A avaliação da toxicidade eritropoiética é uma componente chave da avaliação de segurança no desenvolvimento de novas drogas, e a contagem de eritrócitos imaturos (ou policromáticos) no sangue periférico é um dos métodos mais populares e convenientes entre os métodos de acompanhamento da eritropoiese. Diminuições na proporção de eritrócitos imaturos (policromáticos) em relação aos eritrócitos maduros (normocromáticos) são consideradas como um indicador de mutagenicidade induzida por citotoxicidade (SCHMID, 1975; SUZUKI *et al.*, 1989). Entretanto, a relação policromáticos/normocromáticos é uma componente chave na avaliação da citotoxicidade, incluídos rotineiramente em testes de micronúcleo em mamíferos (CRISWELL *et al.*, 1998; CELIK *et al.*, 2003). Entretanto, existem vários trabalhos disponíveis na literatura pertinente que combinam a relação policromáticos/normocromáticos e o teste do micronúcleo em peixes. PACHECO e SANTOS (2002) relataram em seu trabalho que a frequência de eritrócitos policromáticos do sangue periférico de *Anguilla anguilla* diminuiu, enquanto que as frequências de micronúcleos aumentaram como um resultado de tratamentos com benzo[a]pireno, ácido dehidroabiético e efluentes de fábricas de papel. Em outro estudo foi relatada a diminuição da taxa de eritrócitos imaturos (policromáticos) em sangue periférico, de peixes em áreas contaminadas com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) (SMITH, 1990). ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA

(2005a) após analisarem o sangue periférico de exemplares de *Oreochromis niloticus* relataram uma diminuição significativa na taxa de PCE/NCE, posterior ao tratamento com o agente antibiótico e antiparasítico metronidazol (MTZ). No presente trabalho, apesar de não ter sido observada diferença significativa entre os grupos controle e tratados, a existência de uma diminuição da frequência da relação EI/EM pode ser observada quando houve aumento da concentração do metilmercúrio (FIGURA 8), levando-nos a concluir que o metilmercúrio provocou uma atividade citotóxica que levou à diminuição dos eritrócitos imaturos com o aumento da concentração do xenobionte.

Contudo, células circulantes anormais tendem a ser removidas pelo organismo mais rapidamente do que aquelas não danificadas (DAS e NANDA, 1986), informação que foi corroborada pela ocorrência de hemossiderose esplênica concomitantemente com a expressão de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos por PACHECO e SANTOS (2002). Considerando-se as evidências anteriores, bem como as observações de MINISSI *et al.* (1996) e PACHECO E SANTOS (2002) sobre a importância de se conhecer a cinética eritrocitária dos peixes, no atual estudo, foi avaliada a frequência dos EI, como uma tentativa de se esclarecer os resultados obtidos com as alterações morfológicas nucleares. O aumento da concentração de metilmercúrio causou uma diminuição das médias das frequências dos eritrócitos imaturos, o que realmente nos mostra uma relação importante entre o aumento do contaminante e a cinética dos eritrócitos. A determinação da frequência de EI fornece informações importantes sobre a dinâmica hematológica, mas a sua análise isolada não permite uma identificação clara da causa, uma vez que reflete o equilíbrio entre uma variedade de fatores, tais como a entrada de células imaturas versus a remoção esplênica das células, bem como a taxa de maturação celular.

Alguns estudos têm demonstrado que o ensaio cometa é realmente capaz de detectar danos ao DNA causado por diferentes classes de xenobiontes em peixes, atribuindo alta sensibilidade ao teste. Neste caso, podemos indicar alguns trabalhos de maior relevância, como por exemplo, PANDRANGI *et al.* (1995), que evidenciou um aumento dos danos ao DNA em eritrócitos de bagres (*Ameiurus nebulosus*) e carpas (*Cyprinus carpio*) após a captura dos peixes em regiões sabidamente contaminadas por HPAs e PCBs. Os resultados do ensaio cometa foram

condizentes com o grau de contaminação dos locais, comprovando a sensibilidade do ensaio.

No presente trabalho, o ensaio cometa em células do sistema eritrocitário mostrou diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos tratados com metilmercúrio (FIGURA 9). Em experimentos realizados por FERRARO *et al.* (2004), trabalhando com condições semelhantes de contaminação trófica (13 doses tróficas em um período de 60 dias) utilizando uma concentração de  $21\mu\text{g Pb}^{2+}/\text{g}$  em *H. malabaricus*, verificou um aumento na frequência de alterações nucleares, alterações cromossômicas e também um aumento significativo de nucleóides com cauda em peixes tratados com  $\text{Pb}^{2+}$ , mostrando mais uma vez que a exposição prolongada aos xenobiontes, neste caso o chumbo, são capazes de originar danos ao material genético de peixes. Outro trabalho realizado com peixe, mais especificamente em *Hoplias malabaricus*, submetido à contaminação aguda por diferentes concentrações de chumbo inorgânico (RAMSDORF *et al.*, *in press*), demonstrou resultados negativos com relação ao teste de micronúcleo písceo, porém apresentou resultados positivos para o ensaio cometa em eritrócitos.

DEVAUX *et al.* (1997), verificou um aumento no tamanho das caudas dos nucleóides, após a exposição dos hepatócitos de *Onchorynchus mykiss* a benzo[a]pireno e peróxido de hidrogênio. No presente trabalho, não verificamos diferenças significativas entre os organismos controle e os tratados com metilmercúrio, após análise pelo ensaio cometa em células do tecido renal. RAMSDORF *et al.* (*in press*) também realizou o ensaio cometa para o tecido renal, não obtendo com este um resultado significativo. Neste caso, o sangue apresentou uma maior sensibilidade ao teste, possivelmente devido ao tipo de contaminação realizado. Possivelmente o resultado do presente trabalho revelou-se desta forma devido à presença de outro órgão na detoxificação desse composto. O fígado é o principal local de biotransformação do metilmercúrio nos animais, e o rim é o principal órgão hematopoiético nos peixes. ALVES COSTA *et al.* (2007) após contaminação de traíras por via trófica 70 dias, 14 ciclos de contaminação com uma concentração de 75 ng de metilmercúrio por grama de peixe, verificou a presença de grânulos atípicos e desorganização das vesículas citoplasmáticas e principalmente, danos mitocondriais nos hepatócitos. Em iguais condições de contaminação por metilmercúrio, MELA *et al.* (2007) verificou os efeitos causados ao fígado e ao rim de *Hoplias malabaricus*. O fator de biomagnificação ( $\text{Hg no predador}/\text{Hg na presa}$ )

alcançou 142 no fígado e 21 no músculo e foi indicativo de uma contaminação relativamente rápida dos órgãos internos por exposição ao contaminante na dieta. O fígado dos indivíduos expostos apresentou infiltração leucocitária, um aumento no número de centros de melano-macrófagos, áreas necróticas e lesões no espaço de Disse. Desordens evidentes e o caos na organização do citoesqueleto sugerem um forte efeito nos hepatócitos, como na posição das organelas e a movimentação das mesmas, bem como no tráfego e na secreção de vesículas. O rim anterior mostrou grandes áreas de necrose, aumento do número de centros de melano-macrófagos, áreas fagocíticas, espaço intracelular entre células parenquimais e células atípicas. Essas injúrias e danos causados aos tecidos sugerem um mecanismo de defesa lento para imobilizar ou eliminar o metilmercúrio ingerido, demonstrando a alta sensibilidade das células dos peixes ao contaminante.

O fígado transforma em compostos prejudiciais alguns metabólitos que são excretados diretamente na bile para continuar a desintoxicação. Quando um composto é excretado na bile e entra no intestino delgado, ele possui dois destinos: ou é reabsorvido no intestino ou é eliminado nas fezes. Neste caso, o metilmercúrio é reabsorvido em um processo chamado entero-recirculação (GORDON; SKET, 1986). Quando o metilmercúrio sofre este ciclo, o resultado global é que o mercúrio é retido pelo organismo e tem um aumento substancial da meia-vida. Se a concentração do composto organomercurial é alta o suficiente, este metabolismo cíclico pode resultar no prolongamento da atividade farmacológica do mercúrio (GORDON; SKET, 1986). O metilmercúrio passa a barreira sangue-cérebro e as membranas nucleares para reagir diretamente com os componentes nucleares e celulares (BOENING, 2000). Provavelmente no rim aconteçam apenas as reações nas quais o metilmercúrio atue diretamente nos componentes nucleares e celulares.

Além disso, as concentrações de sítios alcali-lábeis podem variar no DNA de diferentes tecidos e em diferentes espécies animais. Ao fazer o ensaio cometa em diferentes tecidos, as diferenças morfológicas, coloração características, e frequência dos diferentes tipos de células devem ser verificadas. Alguns dos fatores que podem influenciar os danos as fitas do DNA em um determinado tipo celular dos tecidos incluem heterogeneidade, ciclo celular, volume de células ou frequência de células e a cultura de crescimento. Diferentes tipos celulares podem ter níveis muito diferentes antecedentes de danos únicos as fitas de DNA devido à variação na

excisão, na atividade de reparação, na atividade metabólica, nas concentrações de anti-oxidantes, bem como nas concentrações de outros fatores.

É importante ressaltar ainda a diferença entre as respostas observadas para o resultado do ensaio cometa para as células renais e para as células do sistema eritrocitário. As células sanguíneas apresentaram-se com uma resposta maior na presença do metilmercúrio indicando que este tecido é mais sensível que o tecido renal, provavelmente devido ao tipo de contaminação utilizado (via-trófica), que demandaria mais tempo de exposição e possivelmente um aumento na concentração do contaminante. Conseqüentemente, o ensaio cometa é uma ferramenta importante para estudos de monitoramento por se mostrar mais sensível a agentes sabidamente mutagênicos, como pudemos perceber no presente trabalho para as células eritrocitárias. Este trabalho reforça a idéia de BELPAEME, COOREMAN e KIRSCH-VOLDERS (1998), na qual diz que a resposta pode depender de condições experimentais de cada espécie, do tipo celular, bem como do agente mutagênico e do tempo de exposição.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e ao grupo Aquatóxi. Esta pesquisa foi financiada pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), através da verba PROF ao PPGGEN bem como a aquisição na Edital pró-equipamentos/2007 de uma câmera de captura.

#### 4. Conclusões

A espécie *Hoplias malabaricus* é um organismo relativamente fácil de se manter em condições laboratoriais e, por ser uma espécie endêmica, possui fundamental importância para o desenvolvimento de estudos de genotoxicidade e monitoramento ambiental, apesar de no presente trabalho não ter apresentado resultados de destaque, possivelmente devido às baixas concentrações utilizadas.

A ausência de micronúcleos não necessariamente significa a ausência de efeitos genotóxicos da substância. Muito provavelmente esta ausência está relacionada com a falta de algumas informações devido ao forte efeito citotóxico do metilmercúrio, ocasionando a morte celular em grande escala, causando um efeito falso negativo. Através dos resultados obtidos neste trabalho, corroborados por outros trabalhos, existem fortes evidências de que as alterações morfológicas nucleares encontradas devem ser consideradas como manifestações dos efeitos genotóxicos da maioria dos contaminantes em peixes.

O aumento da concentração de metilmercúrio causou uma diminuição das médias das frequências dos eritrócitos imaturos, o que realmente nos mostra uma relação importante entre o aumento do contaminante e a cinética dos eritrócitos. Essa relação nos permite fazer inferências sobre a relação existente entre a cinética celular e a presença de contaminantes em certas doses, e para cada espécie estudada em cada experimento.

O metilmercúrio sabe-se é um potente contaminante do ambiente, com severas consequências para com os seres que nele habitam, bem como consequências de fundamental importância para quem se alimenta destes organismos. Portanto, os resultados obtidos corroboram dados de outros trabalhos publicados. No entanto, seus mecanismos de atuação diretamente sobre a molécula de DNA permanecem ainda pouco elucidados.

Os resultados mostraram uma atuação do metilmercúrio sobre o mecanismo de divisão celular, que pode ser evidenciado através dos resultados do teste do micronúcleo píficeo, bem como da avaliação das alterações morfológicas nucleares. Já os resultados mostrados através do ensaio cometa em células renais e em células do sistema eritrocitário evidenciam mecanismos de atuação do metilmercúrio ainda não completamente elucidados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S. M. **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress**. American Fisheries Society, Bethesda , Maryland, USA, 2002.

ATSDR: Agency for Toxic Substance and Disease Registry - **Toxicological Profile for Mercury**. U.S.Department of Healthy and Humans Services, Public Health Service, Centres for Disease Control, Atlanta, G.A., 2003.

AKAISHI, F.M. **Aplicação de Biomarcadores de contaminação ambiental em estudos de laboratório e monitoramento em campo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Curitiba, 2003.

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HERMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.G.; TICE, R.; WATERS, M.D.; AITIO, A. IPCS guidelines for monitoring of genotoxicity effects of carcinogen in human. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v.463, p.111-172, 2000.

AL-SABTI, K. Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 85C, p.5-9, 1986.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p. 121-135, 1995.

ALVES COSTA, J.R.M.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, E.; RANDI, M.A.F; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead(II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 82–88, 2007.

ARKHIPCHUK, V.V.; GARANKO, N.N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on *in vivo* fish fin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p.42-52, 2005.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, v. 467, p. 177-186, 2000.

AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do mercúrio**. São Carlos, p.147-149, 2003.

BAINY, A. C. D. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. **Ciência e Cultura**, v.45, p.10-11, 1993.



BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, v. 415 (3), p. 167-184, 1998.

BISINOTI, M.C.; JARDIM, W.F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 593-600, 2004.

BEZERRA, J.F.M., Estimativas de cargas de mercúrio liberadas para o meio ambiente por atividades industriais – caracterização de fontes. **Seminário Nacional: Riscos e consequências do uso do mercúrio**. Rio de Janeiro, 1990.

BOENING, D. W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, v.40, p.1335-1351, 2000.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGERI, P.; PAMPANIN, D.M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 78, S93–S98, 2006.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v.44, p.383-392, 2001.

BRUNETTI, R.; MAJONE, F.; GOLA, I.; BELTRAME, C. The micronucleus test: examples of application to marine ecology. **Mar. Ecol.-Prog. Ser.** v.44, p. 65–68, 1988.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123 -2136, 1990.

CASTRO, R.M.C.;CASATTI, L. The fish fauna from small Forest stream of the upper Paraná river basin, southern Brazil. **Ichthyol.Explor.Freshwat**, v.7, p.337-352, 1997.

CASTRO-GONZÁLEZ, M.I; MÉNDEZ-ARMENTA, M. Heavy metals: Implications associated to fish consumption. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.26, p. 263–271, 2008.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.19, p.107-111, 2005 a.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v.74, p.264–271, 2005 b.

ÇAVAS, T.; GARANKO N.N.; ARKHIPCHUK, V.V. Induction of micronuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 569-574, 2005.

ÇAVAS, T. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: micronucleus test on acridine orange stained fish cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p.352–358, 2008.

CELIK, A., CAVAS, T., ERGENE-GOZUKARA, S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Mutagenesis**, v.18, p.417–721, 2003.

COLLINS, A.; DUŠINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKÁ, M.; PETROVSKÁ, H.; DUTHIE, S.; FILLION, L.; PANAYIOTIDIS, M.; RAŠLOVÁ, K.; VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30(2), p.139-146, 1997.

CRISWELL, K.A.; KRISHNA, G.; ZIELINSKI, D.; URDA, G.A.; THEISS, J.C.; JUNEAU, P.; BLEAVINS, M.R. Use of acridine orange in flow cytometric: assessment of micronuclei induction. **Mutation Research**, v. 414, p.63–75, 1998.

CUVIN, M.L.A., FURNESS, R.W. Mercury and selenium interactions: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 21, p.348–364, 1991.

DAS, R.K.; NANDA, N.K. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of the fish, *Heteropneustes fossilis*, by mitomycin C and paper mill effluent. **Mutation Research**, v. 175, p. 67–71, 1986.

DE FLORA, S.; BENNICELLI, C.; BAGNASCO, M. Genotoxicity of mercury compounds: A review. **Mutation Research**, v.317, p.57-79, 1994.

DEVAUX, A.; PESONEN, M.; MONOD, G. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, v.11, p.71–79, 1997.

DE VRIES, W.; ROMKENS, P.F.A.M.; VAN LEEUWEN, T.; BRONSWIJK, J.J.B. Heavy metals. In: **Agriculture, Hydrology and Water Quality**, CAB International 2002. Eds: P. M. HAYGHART and S. C.JARVIS.

DINNEN, R.D., TOMLINSON, S.M., HART, D., CHOPRA, C., HEDDLE, J.A. Application of a micronucleus assay to the peripheral blood cells of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.**, v.1607, p.69–78, 1988.

DUFFUS, J.H. Chemistry International, v.23, n°6. Disponível em <http://www.iupac.org/publications/pac/2002/pdf/7405x0793.pdf>. Acessado em 24/11/2008.

ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 101. **Methylmercury**. World Health Organization. Geneva. 1990.

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; CELIK, A.; KOLELI, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species

from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**, v. 16, p.385–391, 2007.

ESPINA, N.G.; WEISS, P. DNA repair in fish from polluted estuaries. **Marine Environmental Research**, v. 39, p. 309-312, 1995.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERRARO, M.V.M. **Avaliação do efeito mutagênico do tributilestanho (TBT) e do chumbo inorgânico (PbII) em *Hoplias malabaricus* (Pisces) através dos ensaios: cometa, micronúcleo e aberrações cromossômicas.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Curitiba, 2003.

FERRARO, M V M; FENOCCHIO, A S; MANTOVANI, M S; OLIVEIRA RIBEIRO, C; CESTARI, M M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v.27 (1), p.103-107, 2004.

FLEEGER, J.W.; CARMAN, K.R.; NISBET, R. M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **The Science of the Total Environment**, v. 317, p. 207–233, 2003.

GILLIAN, J.F.; FRASER, D.F. Movement in corridors: Enhancement by predation threat, disturbance, and habitat structure. **Ecology**, v.82, p.258-273, 2001.

GOKSOYR, A.; ANDERSON, T.; BUHLER, D.R.; STEGEMAN, J.J.; WILLIAMS, D.E.; FORLIN, L. Immunochemical cross-reactivity os  $\beta$ -naphthoflavone – inducible cytochrome P450 in liver microsomes from different fish species and rat. **Fish Physiology**, v. 9, p. 1-13, 1991.

GOMES, L.C.; CHIPPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **J.World Aquacult. Soc**, v. 32 (4), p. 426–431, 2001.

GORDON, G.; SKETT, P. **Introduction to Drug Metabolism**. Chapman and Hall, New York, NY.1986.

GRISOLIA, C.K.; CORDEIRO, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23 (1), p. 235-239, 2000.

GUILHERME, S; VÁLEGA, M; PEREIRA, M.E; SANTOS, M.A; PACHECO, M. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an

environmental mercury contamination gradient. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.70 (3), p.411-421, 2008.

GUSTAVINO, B.; SCORNAJJENGHI, K.A.; MINISSI, S.; CICCOTTI, E. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X- Ray and colchicine. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.494, p.151-159, 2001.

HARTMANN, A.; PLAPPERT, U.; POETTER, F.; SUTER, W. Comparative study with the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. **Mutation Research**, v. 536, p. 27–38, 2003.

HARTWIG, A.; Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. **Toxicology Letters**, v.102-103, p.235-239, 1998.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assays systems that use aquatic organisms. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399 (2), p. 125-133, 1998.

HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**, v. 18, p.187-190, 1973.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPRAIS, PH.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as a index of Cytogenetic Damage: past, present and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, p. 277 – 291, 1991.

HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, v. 104, p.147–152, 1982.

HORVÁTHOVÁ,E.; SLAMENOVÁ,D.; HLINCÍKOVÁ, L.; MANDAL, T.K.; GÁBELOVÁ, A.; COLLINS, A.R. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. **Mutation Research – DNA Repair**, v.409, p.163-171, 1998.

HOSE, J.E.; CROSS, JN; SMITH, S.G.; DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminates sites off Southern California. **Marine Environmental Research**, v. 22, p. 167-176, 1987.

KIM, IY; HYUN, CK. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, p.288-297, 2006.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖN, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research – DNA Repair**, v.363, p. 89-96, 1996.

KLOBUCAR, G.I.V.; PAVLICA, M.; ERBEN, R.; PAPES, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquatic Toxicology**, v. 64, p. 15-23, 2003.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research – Reviews in Mutation Research**, v.544, p. 43–64, 2003.

LOPES-POLEZA, S.C.G. **Avaliação do efeito do metilmercúrio ( $\text{CH}^3\text{Hg}^+$ ) em *Hoplias malabaricus*, através da frequência de aberrações cromossômicas e dos ensaios cometa e micronúcleo**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Curitiba, 2004.

LOUREIRO, V.E. Dieta e atividade alimentar de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) do reservatório da UHE de Segredo, PR, no primeiro ano de sua formação. *In*: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA (XI.: 1995: Campinas). **Resumos**. Campinas: Puc, 6-10 fev., 1995. L4, p.12.

MANNA, G.K.; SADHUKHAN, A. Use of cells of gill and kidney of Tilapia fish in micronucleus test (MNT). **Current Science**, v. 55, p. 498-501, 1986.

MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. **Biomarkers of environmental contamination**. Lewis, Boca Raton, USA, 1990.

MELA, M.; RANDI, M.A.F.; VENTURA, D.F.; CARVALHO, C.E.V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, p. 426–435, 2007.

METCALFE, C. D. Testes for Predicting Carcinogenicity in Fish. **CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences**. v. 1, p. 111 – 129, 1989.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**, v. 367, p. 245-251, 1996.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v. 399, p. 135-147, 1998.

MIYAMAE, Y.; YAMAMOTO, M.; SASAKI, Y.F.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI-SOGA, M.; SHIMOI, K.; HAYASHI, M. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mutation Research**, v. 418, p. 131-140, 1998.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3rd edition: John Wiley e Sons, New York, USA, 600 p., 1994.

NEPOMUCENO, J C; FERRARI, I; SPANÓ, M A; CENTENO, A J. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.30, p.293-297, 1997.

NIELSEN, G.; BJERREGAARD, P. Interaction between accumulation of cadmium and selenium in the tissues of turbot *Scophthalmus maximus*. **Aquatic Toxicology**, v.20, p.253–266, 1991.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. **Radiation Research**, v. 122, p. 86 – 94, 1990.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Dinâmica do mercúrio inorgânico ( $\text{Hg}^{++}$ ) e o orgânico ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) e seus efeitos tóxicos em *Trichomycterus zonatus* e *Salvelinus alpinus*. **Tese de Doutorado**, 1997.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microeletrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.123, nº1, p.291-298, 1984 .

PACHECO; M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 331–347, 2002.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, p. 345-356, 1995.

PEDERSEN, T.V.; BLOCK, M.; PART, P. Effect of selenium on the uptake of methyl mercury across perfused gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquatic Toxicology**, v. 40, p. 361–373, 1998.

PLANQUETTE, P.; KEITH, P.; LE BAIL, P.Y. Atlas des poissons d'eau douce de Guyane (tome 1). **Collection du Patrimoine Naturel**, IEGB-M.N.H.N., INRA, CSP, Min. Env., v.22, p.166, 1996.

PORTO, J. I. R.; ARAUJO, C. S. O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**, v. 97, p. 287-292, 2005.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Eds.). **Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1991.

RAMSDORF, W.A; FERRARO, M.V.M; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A; COSTA, J.R.M; CESTARI; M.M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead ( $\text{PbII}$ ) in

*Hoplias malabaricus*. **Environmental Monitoring and Assessment** (2008), doi: 10.1007/s10661-008-0566-1.

RAMSDORF, W.A, GUIMARÃES, F.S.F; FERRARO, M.V.M.; GABARDO, J; TRINDADE, E. S; CESTARI, M.M. Establishment of Experimental Conditions for Preserving Samples of Fish Blood for Analysis with both Comet Assay and Flow Cytometry, **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.673, p.78-81, 2009.

RICHEY, Jr.; GLENN, H.; **Fundamentals of Organic Chemistry**. Englewood Cliffs, 1986.

RIOS, F. S., OBA, E. T., FERNANDES, M. N., KALININ, A. L., & RANTIN, F. T. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, 140, 281–287, 2005.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. 225-254, 1999.

SANCHEZ-GALAN, S; LINDE, A L; GARCIA-VAZQUEZ, E. Brown Trout and European Minnow as Target Species for Genotoxicity Tests: Differential Sensitivity to Heavy Metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.43, p.301- 304, 1999.

SASAKI, Y.F.; TSUDA, S.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E. Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. **Mutation Research**, v. 388, p. 33-44, 1997.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.38 (1), p.38–45, 2001.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S-phase. **J. Cell. Biol.** v.140, p.1307–1320, 1998.

SHIMIZU, N.; SHIMURA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutation Research**. v.448, p. 81 90, 2000.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SKERFVING, S.; HANSSON, K.; MANGS, C.; LINDSTEN, J.; RYMAN, N. Methylmercury-induced chromosomal damage in man. **Environmental Research**, v.7, p. 83-89, 1974.

SMITH, I.R. Erythrocytic micronuclei in wild fish from Lakes Superior and Ontario that have pollution-associated neoplasias. **J. Great Lakes Res.** v.16, p. 139–142, 1990.

SOARES, M.G.M.; ALMEIDA, R.G.; TUNK, W.T. A simple technique for quantitation low levels of DNA damage in individuals cells. **Exp. Cell. Res.** v.175, p.184–191, 1986.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrle, P.M. Jr.; Bergman, H.L. **Biomarkers. Biochemical, Physiological, and Histological markers of antropogenic stress.** Eds. Lewis Publishers, p.235-334, 1992.

SUGIHARA,T; SAWADA,S; HAKURA,A; HORI, Y;UCHIDA, K; SAGAMI, F. A staining procedure for micronucleus test using new methylene blue and acridine orange: specimens that are supravitaly stained with possible long-term storage. **Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.470, p.103–108, 2000.

SUZUKI, Y., NAGAE, Y., LI, J., SABAKA, H., MAZOWA, K., TAKAHASHI, A., SHIMUZU, H. The micronucleus test and erythropoiesis: effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (*P/N* ratio). **Mutagenesis**, v.4, p. 420–424, 1989.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear abnormalities in buccal smears: methods and development. **Mutation Research**, v. 271, p. 69- 77, 1992.

UEDA, T.; HAYASHI, M.; KOIDE, N.; SOFUNI, T., KOBAYASHI, J. A preliminary study of the micronucleus teste by acridine orange fluorescent staining compared with cromossomal aberration teste using fish erythropoietic and embrionic cells. **Water Science and Technology**, v.25, p. 235-240, 1992.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**. v.79, p.201-204, 2006.

U S DEPARTAMENT OF LABOR (OSHA- Occupational Safety and Health Administration). <http://www.osha.gov/SLTC/metalsheavy/index.html>. Acessado em 24/11/2008.

USEPA. **EPA's Terms of Environment.** United States Environmental Protection Agency, Washington- DC, 2000.



VAN DER OOST, R; BEYER, J; VERMEULEN, NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p.57-149, 2003.

VERSCHAEVE, L.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HENS, L.; SUSANNE, C. Comparative *in vitro* cytogenetics in mercury-exposed human lymphocytes. **Mutation Research**, v.157, p.221-226, 1985.

WHO, Methylmercury. **Environmental Health Criteria**, v. 101, p. 144, Geneva, 1990.

WHO, Regional Office for Europe, Copenhagen, Dinamarca. Capítulo 6.9: **Mercury** 2000.

WIKIPÉDIA: <http://en.wikipedia.org/wiki/Methylmercury>. Acessado em 24/11/2008.

WILLIAMS, R.C.; METCALFE, C.D. Development of an *in vitro* hepatic micronucleus assay with rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v.23, p.193-202, 1992.

WIENER; J.G; SPRY, DJ. Toxicological significance of mercury in freshwater fish. In: NELSON BEYER, W; HEINZ, G.H; REDMON-NORWOOD, A.W. (Ed). **Environmental contaminants in wildlife**, CRC Press, Lewis, cap.13, 1996.

WREN, C.D.; HARRIS, S; HARTTRUP, N. Ecotoxicology of Mercury and Cadmium. In: HOFFMAN, D.J. et al. (Ed). **Handbook of Ecotoxicology**, Boca Raton, Lewis, cap.17, 1995.

YENDLE, J. E.; TINWELL, H.; ELLIOT, B. M.; ASHBY, J. The genetic toxicity of time: Importance of DNA – unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 375, p.125-136, 1997.

## **ANEXO I**

### **Metodologia**

#### **Teste do Micronúcleo Písceo (MNP)**

A fim de se verificar a frequência de micronúcleos em hemácias periféricas, foi empregada a técnica descrita por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975), com algumas modificações. A técnica aplicada consiste nas seguintes etapas:

- a) As lâminas foram bem limpas e identificadas.
- b) Ao se coletar o sangue do animal, pingou-se uma gota na superfície da lâmina.
- c) Com o auxílio de uma lamínula, foi feito um esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina, sempre em um único sentido apenas.
- d) As lâminas, após secagem ao ar, foram fixadas em etanol 96%, por 30 minutos.
- e) As lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 8,6), por 15 minutos.
- f) As lâminas foram analisadas em teste cego, sendo que, foram analisadas 2000 células de cada animal. Na análise, foram consideradas somente hemácias nucleadas com membranas nuclear e citoplasmática intacta. Serão consideradas como micronúcleos as partículas que em relação ao núcleo principal não excederem 1/3 do seu tamanho, estiverem nitidamente separadas, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo. As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadrarem no conceito de micronúcleo, mas que poderiam ser descritas como alterações morfológicas nucleares também serão analisadas segundo CARRASCO, TILBURY e MYERS (1990) e computadas como AMN.

#### **Teste do Micronúcleo em Eritrócitos Imaturos (EI)**

A fim de se verificar a frequência de micronúcleos em eritrócitos jovens, foi empregada a técnica descrita por ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA (2005), com algumas modificações e a coloração dos eritrócitos realizada de acordo com UEDA et al. (1992). A técnica aplicada consiste nas seguintes etapas:

- a) As lâminas foram bem limpas e identificadas.
- b) O sangue coletado (aproximadamente 1 ml) foi colocado em microtubos do tipo Eppendorf ®. Para a realização do ensaio cometa foram coletados 10µl de sangue de cada microtubo e misturados com 1 ml de soro bovino fetal. Neste caso, da mesma diluição retirou-se 10µl e colocou-se na superfície da lâmina.
- c) Com o auxílio de uma lamínula, foi feito um esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina, sempre em um único sentido apenas.
- d) As lâminas foram então deixadas para secar *overnight* e foram fixadas, posteriormente em metanol, durante 10 minutos.
- e) A coloração de laranja de acridina apenas foi acrescentada imediatamente antes da análise microscópica. As células foram coradas com laranja de acridina a 0.003%, em tampão Sorenson com pH 6.8, por 2-3 minutos e montadas com o mesmo tampão. As lâminas foram então analisadas ao microscópio de epifluorescência, com aumento de 400x.
- f) A análise foi feita em teste cego, sendo que, foram analisadas 2000 células de cada animal. Na análise, foram consideradas somente hemácias nucleadas com membranas nuclear e citoplasmática intacta.

### **Ensaio Cometa**

A técnica utilizada foi a descrita por SINGH *et al.* (1988) com algumas modificações realizadas por FERRARO (2003). Antes da coleta do material para análise, foram preparadas as lâminas com cobertura de agarose e a agarose de baixo ponto de fusão (LMP) segundo as etapas descritas a seguir:

#### **Preparação das lâminas com cobertura de agarose**

- a) Foram dissolvidos 1,5 g de agarose normal em 100 ml de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas. Essa mistura foi então levada ao forno de microondas até sua fervura e completa dissolução.
- b) Após fervura, a agarose foi deixada em temperatura ambiente. Após a solidificação da agarose, esta foi picada e levada novamente ao forno de microondas. Essa etapa foi repetida pelo menos três vezes. Ao final desse processo, a agarose foi mantida em banho-maria a 70°C.

c) As lâminas, previamente limpas, foram então mergulhadas na agarose aquecida, sendo o lado da lâmina contendo a porção não esmerilhada limpo com um lenço de papel e álcool. d) As lâminas foram deixadas para secar *overnight* em superfície plana e à temperatura ambiente, para solidificação da cobertura de agarose.

### **Preparação da agarose de baixo ponto de fusão (LMP)**

- a) Foram dissolvidos 100 mg de agarose normal em 20 ml de PBS.
- b) Essa solução foi então levada para fervura em forno de microondas somente uma vez.
- c) A agarose LMP foi mantida em geladeira até o momento do uso, quando foi então aquecida em banho-maria e mantida em 37°C.

### **Sangue**

- a) O sangue coletado (aproximadamente 1 ml) foi colocado em microtubos do tipo Eppendorf ®. Para a realização do ensaio cometa foram coletados 10µl de sangue de cada microtubo e misturados com 1ml de soro bovino fetal. Os microtubos foram mantidos sobre refrigeração e no escuro até a realização do ensaio.
- b) Desta solução, foram coletados 10µl e misturados com 120µl de agarose LMP (low melting point), sendo esta suspensão celular depositada sob uma lâmina com cobertura de agarose.
- c) Após a deposição da mistura agarose e suspensão celular sob a lâmina, foram colocadas lamínulas sobre cada lâmina e em seguida estas foram submetidas à refrigeração.
- d) Após a refrigeração, as lamínulas foram gentilmente retiradas.
- e) Estas foram então, acondicionadas em cubetas, contendo solução de lise por, pelo menos, 24 horas.
- f) Após o tempo de lise, as lâminas foram então transferidas para a cuba de eletroforese. A eletroforese foi realizada sobre refrigeração e na ausência de luz, com uma solução de eletroforese com pH maior que 13.
- g) Antes do início da corrida eletroforética, as lâminas permaneceram na solução de eletroforese por pelo menos 30 minutos, para a desespiralização do DNA.
- h) Em seguida, a corrida de eletroforese foi iniciada a 25V e 300 mA por 25 minutos.

- i) Após o término da corrida, as lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas com um tampão de neutralização (pH 7,5) por 3 seções de 5 minutos cada.
- j) As lâminas foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos.
- l) Para a análise das lâminas, foram adicionados 20µl de brometo de etídeo em cada uma delas. Cada lâmina foi então coberta com lamínula e levada ao microscópio de epifluorescência com aumento de 400x.
- m) Foram analisados 100 núcleos em cada lâmina. Os núcleos foram classificados de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética. A classificação dos núcleos será realizada conforme as classes: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano máximo) e 4 (núcleo possivelmente em apoptose). Foram realizadas as quantificações dos tipos de danos e a atribuição de escores em cada classe. Os escores foram obtidos através da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

### **Tecido Renal**

Para a realização do ensaio cometa utilizando tecido renal, foi utilizada uma metodologia que se constituiu das seguintes etapas:

- a) Após o sacrifício dos animais e a retirada de sangue, foi retirado o tecido renal que foi mantido em tampão Tris-HCl-Sacarose (pH 8,6) em gelo, e no escuro;
- b) O tecido renal com o tampão Tris-HCl-Sacarose foi então levado para homogeneização em homogeneizador Potter® a 1500 rpm por cerca de 30 segundos;
- c) Do homogeneizado obtido, foram coletados 40µl em microtubos do tipo Eppendorf®.
- d) Para a realização do ensaio cometa, os 40µl coletados de homogeneizado foram então misturados com 120µl de agarose LMP (low melting point – baixo ponto de fusão).
- e) A suspensão celular assim obtida foi utilizada para a montagem das lâminas, conforme o procedimento descrito acima para eritrócitos.

## ANEXO II

### Guide for Authors - Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

#### Types of Articles

*Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* publishes the following types of article: (I) **Research papers**- papers reporting results of original, fundamental research. (II) **Short communications** of up to 5 printed pages. (III) **Rapids** - are accelerated publications - research papers identified by the Editor as being of significant quality and thereby qualifying for rapid reviewing, and publication within 8-10 weeks of acceptance. (IV) **Current issues** are generally short, 1-2 page comments on a topical theme, and are published within 10 weeks of acceptance. (V) Volunteered and invited **Mini-reviews** of less than 10 printed pages, using references generally no later than 2 years old. The journal accepts letters to the Editor.

Please note that full-length reviews comprehensively covering and critically analysing a topic are published in *Mutation Research Reviews*. Also published in the *Reviews* section are invited papers in the series **Reflections in Mutation Research**, in which research and techniques that have played an important part in the development of the field of mutation research are revisited and their significance discussed. **Special issues**, comprising multiple original and/or review articles written from a particular viewpoint, on a central theme, are published on a regular basis in the appropriate section of *Mutation Research* by topic or article type.

It is the policy of the Editors to conduct a preliminary review of each submitted manuscript that reports results of studies on extracts or complex mixtures. If such papers do not offer new data and insight on the chemical nature of the active components or their mechanisms of action, the manuscript will be returned to the authors without being sent for further review.

#### Conflict of Interest Statement

The Journal requires full disclosure of all potential conflicts of interest. Please declare any financial or personal interests that might be viewed to inappropriately influence the work presented. Interests could include employment, consultancies, stock ownership and honoraria. If there are no conflicts of interest, the authors should state, "The authors declare that there are no conflicts of interest". If there are any financial or personal interests please state so here and include this statement as an Acknowledgement in your submitting manuscript. Signed copies of the *Mutation Research- Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* Conflict of Interest policy form are required upon submission. The Conflict of Interest policy form can be downloaded. In order to minimize delays, we strongly advise that the signed copies of these statements are prepared before you submit your manuscript.

### **On-line Submission**

Authors are encouraged to submit their manuscript on-line via the Elsevier Editorial System page of this journal (<http://ees.elsevier.com/mutgen/>) where you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to four individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

Once the uploading is done, the system generates an Acrobat PDF version of the article which is used for the reviewing process. Authors, Reviewers and Editors send and receive all correspondence by e-mail, and no paper correspondence is necessary. Note that compuscripts are converted into PDF for the review process but may need to be edited after acceptance to follow journal standards. For this an "editable" file format is necessary.

If traditional submission is preferred articles should be submitted in triplicate (one original and two copies, and three set of original illustrations), together with an electronic version on disk, to one of the Editors (see below for addresses).

*Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original work and that it has not been published or submitted for publication elsewhere. It also implies the transfer of the Copyright from the author to the publisher.*

### **General arrangement of papers**

Papers should be in English, typewritten, and double-spaced. Final versions should be accompanied by a diskette (see 'Electronic manuscripts' below). They should include **key words** (3-6 words or short phrases) and an **abstract** of up to 300 words. The Introduction should summarize the research problem and the pertinent findings. The text may be divided into sections such as Materials and methods, Results, Discussion, etc. All main sections should be numbered. In papers mentioning chemicals, authors are requested to include *CAS registry numbers*.

### **Preparation of text**

Each manuscript should have a separate title page which includes only the title, authors' full names and complete addresses of academic or professional affiliations; the author to whom proofs and correspondence should be addressed should be indicated by an asterisk and a **telephone/fax number and e-mail address** included.

### **Preparation of illustrations**

For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

### **Colour illustrations**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. Polaroid prints are not suitable. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge that these figures will appear in colour on the Web (e.g. Science Direct and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the web only.



## Tables

Should be typed with double line spacing and should have a heading.

## References

Only papers using the numbered reference system will be accepted, i.e. references are numbered by order of citation in the text. Journal titles should be abbreviated to conform with the Chemical Abstracts Bibliographic Guide for Authors and Editors 1974.

Examples:

[1] B.N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Res.* 31 (1975) 347-363.

[2] L. Ehrenberg, C.A. Wachtmeister. Safety precautions in work with mutagenic and carcinogenic chemicals, in: B.J. Kilbey, M.S. Legator, W. Nichols and C. Ramel (Eds.), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier, Amsterdam, 1977, pp. 401-410.

## Nomenclature

Authors are requested to adopt the nomenclature system for human gene mutations recommended by the HUGO MDI Nomenclature Working Group. Guidelines for this system can be found at <http://journals.wiley.com/1059-7794/nomenclature.html>.

## Proofs

When a manuscript is received by the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are automatically sent to the corresponding author. Only printer's errors may be corrected, no changes in or additions to the edited manuscript will be accepted. To return corrected proofs by courier service, please send to: Log-in Department, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Elsevier Ireland Ltd., Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

## Offprints

25 offprints of each article are sent to the author(s) free of charge. Additional offprints can be ordered by the author(s). Offprint requests after publication will be subject to an extra charge.

## Information

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage at <http://www.elsevier.com/journals>. From here you can also track accepted articles (<http://www.elsevier.com/trackarticle>) and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more.

All questions arising after acceptance of a manuscript, especially those relating to proofs, publication and reprints, should be directed to the Journal Manager, Brigitte Neilson at Elsevier Ireland Ltd., Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland; Tel: +353 61 709 154; Fax: +353 61 709 109, Email: [b.neilson@elsevier.com](mailto:b.neilson@elsevier.com).

Free access to scientific publications for public institutions in developing countries

The Health InterNetwork Access to Research Initiative (HINARI) is an initiative to provide free or nearly free access to the major journals in biomedical and related social sciences, to public institutions in developing countries. Starting in January 2002 with over 2000 journals from Elsevier and other leading biomedical publishers, HINARI is part of the Health InterNetwork which was introduced by the United Nations' Secretary General Kofi Annan at the UN Millennium Summit in the year 2000.

For further information and registration, please check the HINARI site: [www.healthinternetwork.net](http://www.healthinternetwork.net)

*US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting "Public Access Policy"*

Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://publicaccess.nih.gov/>) by submitting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, immediately after final publication. Please e-mail us at [NIHauthorrequest@elsevier.com](mailto:NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH grant/project number(s), as well as name and e-mail address of the Principal Investigator(s)) and that you intend to respond to the

NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for public access posting 12 months after the final publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited (although Elsevier will not request that manuscripts authored and posted by US government employees should be taken down from PubMed Central). Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

### **Language Services**

Authors who require information about language editing and copyediting services pre-and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing> or contact [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com) for more information.

Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>

## APÊNDICES

### APÊNDICE 01 – RESULTADOS GERAIS ENCONTRADOS PARA AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES, CÉLULAS NORMAIS E TOTAIS DE CÉLULAS ANALISADAS PARA COLORAÇÃO CONVENCIONAL, EM INDIVÍDUOS CONTAMINADOS COM 0,75µg/g DE CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>.

Indivíduos Dose 0,75	Número de células alteradas	Células Normais	Total de células analisadas
10	27	1973	2000
34	15	1983	2000
35	42	1958	2000
4	23	1977	2000
28	19	1981	2000
2	33	1987	2000
3	15	1983	2000
5	10	1990	2000
7	27	1973	2000
11	36	1964	2000
21	24	1976	2000
25	61	1939	2000
32	54	1946	2000
33	16	1984	2000
39	12	1988	2000

**APÊNDICE 02 – RESULTADOS GERAIS ENCONTRADOS PARA AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES, CÉLULAS NORMAIS E TOTAIS DE CÉLULAS ANALISADAS, PARA COLORAÇÃO CONVENCIONAL, EM INDIVÍDUOS CONTAMINADOS COM 0,075µg/g DE CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>.**

Indivíduos Dose de 0,075	Número de células alteradas	Células Normais	Total de células analisadas
20	40	1960	2000
37	30	1970	2000
38	7	1993	2000
17	44	1956	2000
30	16	1984	2000
9	46	1954	2000
13	16	1984	2000
16	42	1958	2000
18	36	1964	2000
19	19	1981	2000
22	22	1978	2000
26	37	1963	2000
29	88	1912	2000
31	52	1948	2000
40	8	1992	2000

**APÊNDICE 03 – RESULTADOS GERAIS ENCONTRADOS PARA AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES, CÉLULAS NORMAIS E TOTAIS DE CÉLULAS ANALISADAS, PARA COLORAÇÃO CONVENCIONAL, EM INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE.**

Indivíduos Controles	Número de células alteradas	Células Normais	Total de células analisadas
14	31	1969	2000
36	26	1974	2000
44	7	1993	2000
42	21	1979	2000
1	50	1950	2000
6	64	1936	2000
8	64	1936	2000
12	27	1973	2000
15	71	1929	2000
23	64	1936	2000
24	43	1957	2000
27	44	1956	2000
43	6	1994	2000

**APÊNDICE 04 – RESULTADOS ENCONTRADOS PARA AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES, CÉLULAS NORMAIS E TOTAIS DE CÉLULAS NORMOCROMÁTICAS E POLICROMÁTICAS ANALISADAS, PARA INDIVÍDUOS CONTAMINADOS COM 0,75µg/g DE CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> .**

Indivíduos	Policromático		Normocromático		
Dose de 0,75	Normal	Alterado	Normal	Alterado	Total
10	283	7	1690	20	2000
34	478	1	1522	5	2000
35	80	10	1841	69	2000
4	142	7	1823	28	2000
28	13	0	1951	35	2000
2	314	10	1635	41	2000
3	189	2	1789	20	2000
5	244	1	1739	16	2000
7	19	0	802	22	2000
11	69	0	1893	38	2000
21	418	7	1552	27	2000
25	142	8	1958	62	2000
32	159	5	1739	97	2000
33	166	0	1810	24	2000
39	151	4	1813	57	2000

**APÊNDICE 05 – RESULTADOS ENCONTRADOS PARA AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES, CÉLULAS NORMAIS E TOTAIS DE CÉLULAS NORMOCROMÁTICAS E POLICROMÁTICAS ANALISADAS, PARA INDIVÍDUOS CONTAMINADOS COM 0,075µg/g DE CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>.**

Indivíduos	Policromático		Normocromático		
Dose de 0,075	Normal	Alterado	Normal	Alterado	Total
20	289	2	1704	35	2000
37	457	11	1473	59	2000
38	227	15	1708	50	2000
17	61	1	1867	70	2000
30	203	14	1746	37	2000
9	437	17	1479	67	2000
13	66	0	1901	33	2000
16	186	6	1750	58	2000
18	240	7	1696	57	2000
19	141	5	1803	51	2000
22	140	3	1828	29	2000
26	115	1	1819	65	2000
29	164	14	1715	107	2000
31	343	10	1582	75	2000
40	89	0	1904	7	2000



**APÊNDICE 06 – RESULTADOS ENCONTRADOS PARA AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES, CÉLULAS NORMAIS E TOTAIS DE CÉLULAS NORMOCROMÁTICAS E POLICROMÁTICAS ANALISADAS, PARA INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE.**

Indivíduos		Policromático		Normocromático	
Controles	Nomal	Alterado	Normal	Alterado	Total
14	97	1	1876	26	2000
36	215	4	1741	40	2000
44	201	1	1764	34	2000
42	283	4	1660	53	2000
1	270	13	1684	33	2000
6	292	12	1671	25	2000
8	338	10	1616	36	2000
12	375	4	1557	44	2000
15	231	4	1695	70	2000
23	434	9	1508	49	2000
24	246	3	1719	32	2000
27	178	8	1760	54	2000
43	129	0	1865	6	2000

**APÊNDICE 07 – TOTAIS DE CÉLULAS ANALISADAS NO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS POR INDIVÍDUOS CONTAMINADOS COM 0,75µg/g DE CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>, OS RESPECTIVOS TIPOS DE DANO ENCONTRADOS E ESCORES.**

Indivíduos		Classes					
Dose de 0,75	0	1	2	3	4	Total	Escore
10	9	16	28	29	18	100	231
34	18	21	21	25	15	100	198
35	2	3	28	50	17	100	276
4	4	2	28	47	18	100	271
28	3	8	20	57	12	100	267
2	4	9	28	30	29	100	271
3	5	6	32	53	5	100	249
5	4	10	8	28	51	100	314
7	5	12	25	36	22	100	258
11	4	9	9	49	29	100	290
21	2	11	31	43	13	100	254
25	6	23	17	26	28	100	247
32	2	19	15	37	27	100	268
33	3	6	12	50	29	100	296
39	2	6	12	50	30	100	300

**APÊNDICE 08** – TOTAIS DE CÉLULAS ANALISADAS NO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS POR INDIVÍDUOS CONTAMINADOS COM 0,075µg/g DE CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>, COM OS RESPECTIVOS TIPOS DE DANO ENCONTRADOS E ESCORES.

Indivíduos		Classes						
Dose de 0,075	0	1	2	3	4	Total	Escore	
20	7	17	34	31	12	100	226	
37	2	7	36	40	15	100	259	
38	6	4	18	57	16	100	275	
17	3	3	50	20	25	100	263	
30	1	5	21	38	35	100	301	
9	7	19	31	34	9	100	219	
13	4	9	37	34	16	100	249	
16	7	12	32	19	30	100	253	
18	3	14	49	12	23	100	240	
19	4	9	57	21	9	100	222	
22	2	1	3	46	48	100	337	
26	2	0	42	42	14	100	266	
29	4	2	32	41	21	100	273	
31	3	8	6	24	59	100	328	
40	11	21	13	37	18	100	230	

**APÊNDICE 09 – TOTAIS DE CÉLULAS ANALISADAS NO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS POR INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE, COM OS RESPECTIVOS TIPOS DE DANO ENCONTRADOS E ESCORES.**

Indivíduos		Classes					
Controles	0	1	2	3	4	Total	Escore
14	17	27	28	18	10	100	177
36	27	39	12	10	14	100	149
44	18	18	30	25	10	100	193
42	13	21	29	30	7	100	197
1	14	26	24	20	16	100	198
6	25	50	5	10	11	100	134
8	13	29	35	12	11	100	179
12	12	33	32	14	9	100	175
15	15	42	4	10	31	100	204
23	19	37	11	9	25	100	186
24	23	44	19	6	8	100	157
27	18	44	15	13	11	100	144
43	22	27	14	18	19	100	185

**APÊNDICE 10** – TOTAIS DE CÉLULAS ANALISADAS NO ENSAIO COMETA EM CÉLULAS DO TECIDO RENAL POR INDIVÍDUOS CONTAMINADOS COM 0,75µg/g DE CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>, COM OS RESPECTIVOS TIPOS DE DANO ENCONTRADOS E ESCORES.

Indivíduos		Classes					
Dose de 0,75	0	1	2	3	4	Total	Escore
10	41	18	15	20	6	100	132
34	24	22	25	21	8	100	167
35	48	25	15	7	6	100	100
4	10	23	42	18	7	100	189
28	13	20	11	31	25	100	235
2	4	6	30	41	20	100	269
3	6	16	22	32	25	100	159
5	25	28	20	17	10	100	159
7	26	24	23	20	7	100	158
11	38	39	12	10	1	100	97
21	9	17	24	32	19	100	237
25	1	7	11	35	46	100	222
32	4	13	41	28	14	100	235
33	2	11	12	57	19	100	282
39	0	1	1	7	91	100	388

**APÊNDICE 11 – TOTAIS DE CÉLULAS ANALISADAS NO ENSAIO COMETA EM CÉLULAS DO TECIDO RENAL POR INDIVÍDUOS CONTAMINADOS COM 0,075µg/g DE CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>, COM OS RESPECTIVOS TIPOS DE DANO ENCONTRADOS E ESCORES.**

Indivíduos		Classes					Total	Escore
Dose de 0,075		0	1	2	3	4		
20		8	49	18	17	8	100	168
37		21	41	9	20	9	100	155
38		0	1	17	59	22	100	300
17		4	6	4	52	36	100	314
30		23	33	8	20	16	100	173
9	Esta lâmina apresentou células intactas							
13	Esta lâmina apresentou células intactas							
16		19	36	18	13	14	100	167
18		13	30	11	27	19	100	209
19		16	33	13	12	27	100	203
22		11	16	16	37	18	100	231
26		17	63	10	7	3	100	116
29		22	28	18	17	15	100	175
31		29	16	14	22	19	100	186
40		13	16	19	27	25	100	143

**APÊNDICE 12 – TOTAIS DE CÉLULAS ANALISADAS NO ENSAIO COMETA EM CÉLULAS DO TECIDO RENAL POR INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE, COM OS RESPECTIVOS TIPOS DE DANO ENCONTRADOS E ESCORES.**

Indivíduos		Classes					Total	Escore
Controles		0	1	2	3	4		
14		44	26	13	12	5	100	108
36		18	42	9	19	13	100	169
44		19	19	9	26	27	100	223
42		9	19	14	40	18	100	239
1		19	28	27	17	9	100	169
6		13	9	3	45	31	100	151
8		63	12	11	5	10	100	75
12		22	23	24	21	10	100	174
15		21	26	26	21	7	100	169
23		18	53	16	8	6	100	83
24		25	50	3	7	15	100	137
27							100	
43							100	